



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E CIÊNCIAS AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

TESE DE DOUTORADO

**INTROGRESSÃO DE ALELOS DE *Arachis* SELVAGENS VISANDO AO AUMENTO
DA TOLERÂNCIA À SECA NO AMENDOIM CULTIVADO**

WELLISON FILGUEIRAS DUTRA

AREIA, PB

2019

WELLISON FILGUEIRAS DUTRA

**INTROGRESSÃO DE ALELOS DE *Arachis* SELVAGENS VISANDO AO AUMENTO
DA TOLERÂNCIA À SECA NO AMENDOIM CULTIVADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Dantas Fernandes

AREIA, PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D978i Dutra, Wellison Filgueiras.

INTROGRESSÃO DE ALELOS DE *Arachis* SELVAGENS VISANDO AO
AUMENTO DA TOLERÂNCIA À SECA NO AMENDOIM CULTIVADO /
Wellison Filgueiras Dutra. - Areia, 2019.

81 f. : il.

Orientação: Roseane Cavalcanti dos Santos.

Coorientação: Pedro Dantas Fernandes.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Alelos selvagens. 2. trocas gasosas. 3. expressão
gênica. 4. atividade antioxidativa. 5. eficiência no
uso da água. I. Santos, Roseane Cavalcanti dos. II.
Título.

UFPB/CCA-AREIA

WELLISON FILGUEIRAS DUTRA

**INTROGRESSÃO DE ALELOS DE *Arachis* SELVAGENS VISANDO AO AUMENTO
DA TOLERÂNCIA À SECA NO AMENDOIM CULTIVADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Agronomia da Universidade Federal da Paraíba, parte
das exigências para obtenção do título de Doutor em
Agronomia.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2019

Prof^ª. Dra. ***Roseane Cavalcanti dos Santos*** – Orientadora
CNPA/Embrapa Algodão

Prof^ª. Dra. ***Edna Ursulino Alves*** – Examinador interno
UFPB/CCA

Prof. Dr. ***Leossávio César de Souza*** – Examinador interno
UFPB/CCA

Prof. PhD. ***José Jaime Vasconcelos Cavalcanti*** – Examinador externo
CNPA/ Embrapa Algodão

Prof. PhD. ***Pedro Dantas Fernandes*** – Examinador externo
UFCG/CTRN

AREIA, PB

2019

A Jesus Cristo, meu guia e fortaleza.

Aos professores e mestres que fizeram parte de toda essa jornada,

da Alfabetização à Pós-Graduação.

A todos familiares e amigos.

Ofereço

A meu pai Genilson e minha mãe Joseni, que sempre estiveram ao meu lado.

A meus irmãos Alexson e Andresa Wrielly, companheiros de toda vida.

A minha esposa Kamilla, o grande amor da minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, o Grande Arquiteto do Universo, pela vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para enfrentar e concluir essa jornada.

Aos meus pais, **Genilson** e **Joseni**, por todo o carinho, educação, por acreditarem nos meus sonhos e não medir esforços para que eu tenha chance de torná-los realidade.

Aos meus irmãos, **Alexson** e **Andresa Wrielly**, pela companhia de sempre, os conselhos, o carinho, a força e confiança.

A minha amada **Kamilla Maria**, pela presença constante em minha vida, por todo amor, companheirismo e atenção.

Aos demais **Familiares**, por todo o carinho e amizade.

A minha orientadora, **Dra. Roseane Santos**, pela orientação, os ensinamentos e a confiança depositada.

Aos **Amigos** pela amizade sincera e incondicional.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Agronomia-PPGA** da Universidade Federal da Paraíba, pela oportunidade e por todo o apoio durante o doutorado.

À **Embrapa Algodão**, pelo apoio e disponibilização da infraestrutura disponível.

Ao **Corpo Docente** do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-PPGA, por dividirem as experiências e ensinamentos.

Ao professor **Pedro Dantas Fernandes** pelo auxílio nas avaliações fisiológicas.

A **Dra. Soraya Leal-Bertioli** e **Dr. David Bertioli** pela colaboração na redação e edição dos artigos científicos.

Aos demais **Professores** e **Mestres**, do ensino fundamental a Pós-Graduação, em especial, **Tia Domerina**, por todos os ensinamentos, carinho e atenção; pelo exemplo de dedicação, superação, força de vontade e, acima de tudo, amor à vocação de lecionar.

Aos **Pesquisadores** da Embrapa Algodão, em especial, **Dra. Liziane Lima e Dr. José Jaime Cavalcanti**, pelo apoio e atenção durante a execução da pesquisa.

A todos os **Colegas e Amigos** do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-PPGA, em especial, **Jean Pierre Ramos, Isaias Almeida, Kércio Estevam, Rennan Pereira e Jarbas Carvalho**, pela colaboração e atenção durante esta caminhada.

Aos companheiros e amigos **Terezinha, Fábria, Juarez, Vandrê, Taíza, Valeska, Jean, Carliane, Daniela, Bruno, Luana, Mizael, Samara, Allef, Alexandre, Damião, Fátima** e todos os demais com os quais tive a oportunidade de conviver durante este período na Embrapa Algodão.

Aos membros da comissão examinadora, **Edna Alves, Leossávio Souza, José Jaime Cavalcanti e Pedro Dantas**, pela pronta disponibilidade e colaboração com o trabalho.

A **Eliane Araújo e Danilo Torquato**, secretários do PPGA, pela atenção e prestatividade.

Aos **Servidores da Embrapa Algodão** em geral, pelo apoio em todas as etapas de execução da pesquisa.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão de bolsa de doutorado.

Muito Obrigado!

Esse é Wellison Filgueiras Dutra

*Eu nasci no pé da serra
No Sertão paraibano
Brejo do Cruz, precisamente
É a cidade que amo.*

*Minha mãe, Professora
Meu pai, Agricultor
A vida sempre foi difícil
Mas nunca deixaram faltar amor.*

*Sempre me ensinaram
O que era essencial
A ter um bom coração
E a ninguém fazer mal.*

*A amar os meus irmãos
Respeitar para ser respeitado
A ter fé no Pai Divino
Mesmo não O “vendo” ao meu lado.*

*A lutar pelos meus sonhos
A chorar quando preciso
Mas a nunca desistir
Porque eles estão sempre comigo.*

*Chego até aqui
Feliz, mesmo que cansado
Satisfeito com meus esforços
E pelo caminho trilhado.*

*Agradeço a oportunidade
Aos professores e amigos
Agradeço a minha família
E minha esposa que sempre esteve comigo.*

*Agradeço, fielmente, a Deus
Por essa vitória, que não é só minha
Por ter me feito paciente
Quando paciência não tinha.*

*E dedico esse trabalho
Aos meus avós que não estão “presentes”
Mas sei que onde estiverem
Por mim, estarão contentes.*

*A minha família querida
Ofereço essa jornada
Pois sem o apoio que me deram
Ela não passaria de um nada.*

*Ao meu pai que está tão feliz
Por me chamar de “meu dotô”
Ao mesmo tempo tão orgulhoso
Em ver aonde mais um filho chegou.*

*Não quero encerrar essas palavras
Sem antes poder dizer
Que “Paiinho” é o exemplo
Do homem que quero ser.*

*Meu orgulho, meu herói
Minha força para continuar
Essa conquista também é dele
Pois não estudou, mas me fez estudar.*

*Não importa se um dia fui “moleque”
E agora serei “doutor”
Minha essência nunca muda,
Homem, humilde, crente e sonhador...*

Por Andresa Wrielly Filgueiras Dutra.

*Na esquina em que se encontram corpo e alma, há música ou silêncio, nada mais.
Nada mais é definitivo na transição entre estações, no lusco-fusco, quando anoitece ou
amanhece. Não há drama, nem comédia nem tragédia, na hora incerta em que se beijam
corpo e alma. (Humberto Gessinger)*

*A fé é uma qualidade do viver do ser humano... A verdadeira fé é a mais alta fidelidade
consciente com Deus... Em sua melhor forma, ela assume o aspecto de serenidade, coragem,
lealdade e serviço... Cultive esta experiência essencial dentro de si...
Ficará maravilhado com a energia que fluirá de seu ser...
(Norman V. Peale e James W. Fowler)*

*Olha devagar para cada coisa.
Aceita o desafio de ver o que a multidão não viu.
Em cascalhos disformes e estranhos, diamantes sobrevivem solitários.
(Padre Fábio de Melo)*

*Jesus é aquele que revela a verdade, Ele é a verdade, o caminho e a vida.
A verdade nos aproxima mais de Cristo, porque ela nos aproxima ainda mais de nós mesmos,
assim podemos entrar naquilo que fala Santo Agostinho:
“Quanto mais humanos, tanto mais divinos”.
(formação.cançãonova.com)*

DUTRA, Wellison Filgueiras. **Introgessão de alelos de *Arachis* selvagens visando ao aumento da tolerância à seca no amendoim cultivado**. 2019. 81f. Tese (Doutorado em Agronomia) PPGA/CCA/UFPB, Areia, Paraíba, Brasil. Orientadora: Roseane Cavalcanti dos Santos.

RESUMO GERAL: A seca é um fenômeno meteorológico que causa perdas significativas na agricultura, principalmente em regiões de clima árido e semiárido, como o Nordeste brasileiro. A utilização de cultivares tolerantes está entre as principais estratégias para a convivência com a seca e o soerguimento do cultivo de espécies relevantes. Nesse contexto, o amendoim é uma oleaginosa de grande importância socioeconômica para o semiárido, predominantemente cultivada por agricultores de base familiar. Por ser uma das poucas espécies tetraploides do gênero *Arachis*, o amendoim cultivado é isolado reprodutivamente dos parentes selvagens, a maioria diploide. Contudo, mesmo com barreiras cromossômicas, a utilização de espécies selvagens é vista como excelente alternativa para ampliar a variabilidade genética do amendoim cultivado e desenvolver novas cultivares adaptadas ao clima semiárido. Atualmente, vários alotetraploides foram obtidos por uma equipe multidisciplinar da Embrapa, os quais estão sendo avaliados quanto à tolerância à seca. No presente estudo foram realizados procedimentos de seleção e validação numa população de alotetraploides de amendoim {BR 1 x [BR 1 x (*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn 2848)^{4x}]} com base na tolerância à seca, utilizando descritores fisiológicos e agronômicos (Capítulo I). Em seguida, alotetraploides de amendoim foram avaliados, em casa de vegetação e campo, focalizando em características moleculares, bioquímicas e agronômicas, com o objetivo de identificar e selecionar plantas com melhor capacidade de se ajustar em condições de estresse hídrico (Capítulo II). Inicialmente, sessenta e quatro alotetraploides foram cultivados em casa de vegetação em Campina Grande-PB durante a estação seca. Após o início do florescimento a irrigação foi suspensa por 15 dias, sendo retomada após este período. Três genótipos foram utilizados como testemunhas: BR1, Senegal 55-437 (tolerantes ao estresse hídrico) e LViPE-06 (sensível ao estresse hídrico). No último dia de estresse foram mensurados as trocas gasosas e o quenching não fotoquímico (NPQ) em todas as plantas. Estes dados foram utilizados na seleção de alotetraploides com tolerância à seca, juntamente com descritores agronômicos relacionados à produção e precocidade. As plantas selecionadas foram cultivadas em dois ambientes (Lagoa Seca e Campina Grande) com o objetivo de validar a tolerância à seca. Os cultivos foram realizados na época das chuvas, sendo avaliados

descritores agronômicos relacionados à precocidade, produção e eficiência no uso da água. A expressão gênica, a atividade dos tipos de superóxido dismutase (SOD) e o conteúdo de prolina também foram avaliados nas plantas selecionadas. Baseado nos ensaios realizados, vários alotetraploides possuem tolerância à seca, com características semelhantes ou superiores as observadas na cultivar atualmente cultivada no Nordeste do Brasil (BR 1). Os alotetraploides possuem níveis diferenciados de expressão nos tipos de SOD e no precursor de prolina, havendo relação entre a produção dos transcritos e a subsequente síntese dos metabólitos. As linhagens 96 P9 e 53 P4 foram mais produtivas e eficientes no uso da água, nas condições avaliadas, denotando serem promissoras para o cultivo em condições de semiárido. A adoção destas linhagens representa uma oportunidade para ampliar a base genética de futuras cultivares, além de subsidiar a utilização de recursos genéticos selvagens em programas de melhoramento voltados para o semiárido.

Palavras-chave: Alelos selvagens, trocas gasosas, expressão gênica, atividade antioxidativa, eficiência no uso da água.

DUTRA, Wellison Filgueiras. **Introgression of wild *Arachis* alleles to increase drought tolerance in cultivated peanut.** 2019. 81f. Thesis (Doctorate in Agronomy) PPGA/CCA/UFPB, Areia, Paraíba, Brazil. Advisor: Roseane Cavalcanti dos Santos.

ABSTRACT: Drought is a meteorological phenomenon that causes significant losses in agriculture, especially in arid and semiarid regions, such as the Brazilian Northeast. The use of tolerant cultivars is among the main strategies for coexist with drought and uplift the relevant species cultivation. In this context, peanut is an oilseed of great socioeconomic importance for the semiarid region, predominantly cultivated by family-based farmers. Because it is one of the few tetraploid species of the genus *Arachis*, cultivated peanut are reproductively isolated from wild relatives, most of them diploid. However, even with chromosome barriers, the wild species use is seen as an excellent alternative to increase the genetic variability of cultivated peanuts and to develop new cultivars adapted to the semiarid climate. Currently, several allotetraploids have been obtained by Embrapa multidisciplinary team, which are being evaluated for drought tolerance. In the present study, selection and validation procedures were performed on a population of peanut allotetraploids {BR 1 x [BR 1 x (*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn 2848)^{4x}]} based on drought tolerance, using physiological and agronomic descriptors (Chapter I). Then, peanut allotetraploides were evaluated in greenhouse and field, focusing on molecular, biochemical and agronomic characteristics, in order to identify and select plants with better ability to adjust to water stress (Chapter II). Initially sixty-four allotetraploids were grown in a greenhouse in Campina Grande-PB during the dry season. After flowering, irrigation was suspended for 15 days and resumed after this period. Three genotypes were used as controls: BR1, Senegal 55-437 (tolerant to water stress) and LViPE-06 (sensitive to water stress). On the last day of stress, gas exchange and non-photochemical quenching (NPQ) were measured in all plants. These data were used in the selection of allotetraploids with drought tolerance, along with agronomic descriptors related to production and precocity. The selected plants were cultivated in two environments (Lagoa Seca and Campina Grande) in order to validate the drought tolerance. Cultivation was carried out in the rainy season, and agronomic descriptors related to precocity, production and water use efficiency were evaluated. Gene expression, superoxide dismutase type's activity (SOD) and proline content were also evaluated in selected plants. Based on the tests performed, several allotetraploids have drought tolerance, with similar or higher characteristics than those observed in the cultivar currently cultivated in the Northeast

of Brazil (BR 1). Alotetraploids have expression differentiated levels of SOD types and the proline precursor, and there is a relationship between the transcripts production and the metabolites synthesis subsequent. The 53 P4 and 96 P9 lines were more productive and efficient in the water use, denoting to be promising for the cultivation in semiarid conditions. The adoption of these materials represents an opportunity to broaden the genetic base of future cultivars, as well as to subsidize the wild genetic resources use in breeding programs facing semiarid.

Keywords: Wild alleles, gas exchange, gene expression, antioxidative activity, water use efficiency.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I	31
Table 1. Pearson correlation between physiological traits: stomatal conductance (gs), net photosynthetic rate (PN), instantaneous carboxylation efficiency (PN/Ci), instantaneous water use efficiency (WUE), non-photochemical quenching (NPQ), transpiration rate (<i>E</i>), and intercellular CO ₂ concentration (C _i) of peanut lines.....	43
Table 2. Summary of combined- variance analyses of anthesis (A), number of pods/plant (NP/P), number of seeds/pod (NS/P) and yield of introgression lines grown in Lagoa Seca (LS) and Campina Grande (CG), Paraíba, Brazil, during rainy season.....	46
 CAPÍTULO II	57
Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos usados nas reações de RT-qPCR.	64
Tabela 2. Correlação de Pearson entre as variáveis: expressão relativa e atividade de <i>Cu/Zn-SOD</i> (CSOD RE e CSOD A), de <i>Mn-SOD</i> (MSOD RE e MSOD A) e de <i>Fe-SOD</i> (FSOD RE e FSOD A), expressão relativa de <i>P5CS</i> (P5CS RE) e conteúdo de prolina em genótipos de amendoim submetidos à suspensão da irrigação.	67
Tabela 3. Resumo da análise de variância combinada, parâmetros genéticos e teste de médias para produção de vagens por parcela (PVP), massa de 100 vagens (M100V) e eficiência no uso da água (EUA) de genótipos de amendoim cultivado em ambientes de Lagoa Seca e Campina Grande, PB, durante a estação das águas de 2016 e 2017, respectivamente.	72
Tabela 4. Ganhos de seleção estimados para produção de vagens por parcela (PVP), massa de 100 vagens (M100V) e eficiência no uso da água (EUA) por meio do índice de Mulamba e Mock (1978).	74

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	31
Figure 1. Summary of the selection steps adopted in breeding of induced allotetraploid BatDur.....	36
Figure 2. Dendrogram obtained by UPGMA using 64 BC1F4 lines, based on physiological traits (gs, E, PN, Ci, PN/Ci, WUE, and NPQ).....	39
Figure 3. Gas exchange of peanut line clustered in G2 group. A- Stomatal conductance (gs), B- transpiration rate (E), C- net photosynthetic rate (PN), D- intercellular CO ₂ concentration (Ci), E- instantaneous carboxylation efficiency (PN/Ci), F- instantaneous water use efficiency (WUE).	41
Figure 4. Non-photochemical quenching (NPQ) of peanut line clustered in G2 group.	42
Figure 5. Phenotypical variants seen in pods and seeds of BC1F4 lines and BR1. A, D and E- Lines 53 P6, 48 P8 and 87 P2 showing small and constricted pods, and small and lighter seeds; B and C- Pods and seeds of BR1.	44
Figure 6. Climate data registered during assays in Lagoa Seca (A) and Campina Grande (B), PB, Brazil.	45
Figure 7. Detail of BC1F6 advanced lines grown in field. A- Plant canopy, B- Pod production, C- seed pattern of 53 P4 (1), 96 P9 (2), and A. hypogaea BR1 (3).....	47
 CAPÍTULO II	 57
Figura 1. Expressão relativa e atividade de <i>Cu/Zn-SOD</i> (A e B), <i>Mn-SOD</i> (C e D) e <i>Fe-SOD</i> (E e F) em genótipos de amendoim submetidos à suspensão da irrigação. As barras representam o intervalo de confiança a 95% de probabilidade.	66
Figura 2. Expressão relativa de <i>P5CS</i> (A) e conteúdo de prolina livre (B) em genótipos de amendoim submetidas à suspensão da irrigação. As barras representam o intervalo de confiança a 95% a 95% de probabilidade.....	69
Figura 3. Dados climáticos registrados durante os ensaios em Lagoa Seca (A) e Campina Grande (B), PB, Brasil.....	71

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1. Aspectos gerais da cultura do amendoim	18
2.2. Espécies selvagens de <i>Arachis</i> e melhoramento do amendoim.....	19
2.3. Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas expostas à seca.....	21
2.3.1. Ajustes no metabolismo fotossintético	22
2.3.2. Aumento da acumulação de osmólitos	22
2.3.3. Incremento na capacidade antioxidativa.....	23
2.4. Alterações moleculares em condições de estresse hídrico	24
3. REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO I	31
4. INTROGRESSION OF WILD ALLELES INTO THE TETRAPLOID PEANUT CROP TO IMPROVE WATER USE EFFICIENCY, EARLINESS AND YIELD	31
4.1. Introduction	34
4.2. Material and methods	35
4.2.1. Plant material.....	35
4.2.2. Initial field selection and physiological assays in green house	37
4.2.3. Validation of tolerant genotypes in field conditions.....	38
4.3. Results and discussion	40
4.3.1. Initial selection procedures and clustering analysis	40
4.3.4. Validation of drought tolerant progenies through field assays	44
4.4. Conclusions	48
4.6. Acknowledgments	48

4.7. S1 Appendix	49
4.8. References	53
 CAPÍTULO II	57
5. ATIVIDADE ANTIOXIDATIVA E PROLINA LIVRE EM ALOTETRAPLOIDES DE AMENDOIM SUBMETIDOS À SUSPENSÃO DA IRRIGAÇÃO	57
5.1. Introdução.....	60
5.2. Material e Métodos.....	62
5.2.1. Recurso genético e condução experimental.....	62
5.2.2. Determinação dos tipos da SOD e de prolina livre	63
5.2.3. Análise de expressão de transcritos	63
5.2.4. Ensaio de validação em campo	64
5.2.5. Análises estatísticas	65
5.3. Resultados e Discussão.....	65
5.3.1. Transcritos das SODs e atividade bioquímica em genótipos de amendoim.....	65
5.3.2. Expressão de P5CS e acúmulo de prolina em genótipos de amendoim	68
5.3.3. Validação e seleção de genótipos de amendoim.....	70
5.4. Conclusões.....	75
5.5. Referências	75
 6. CONCLUSÕES GERAIS	80

1. INTRODUÇÃO GERAL

No cenário mundial de mudanças climáticas, a seca tem se tornado cada vez mais frequente em regiões áridas e semiáridas do planeta, com fortes impactos socioeconômicos para a população em áreas como o Nordeste brasileiro. Nesta região, a ocorrência de períodos secos, em consequência da baixa ou irregular precipitação pluvial, é o fator ambiental que mais limita a agricultura. Nesse contexto, a seca é apontada como o principal desafio para o soerguimento de cultivos com elevada importância socioeconômica, entre eles o amendoim.

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma oleaginosa de larga adaptação ambiental, comumente cultivada nas condições edafoclimáticas do Nordeste brasileiro. Contudo, as perdas provocadas pela seca é um dos gargalos para a expansão da produção em regiões semiáridas, onde o cultivo do amendoim é realizado predominantemente na agricultura de base familiar, sem uso de irrigação suplementar. Para o cultivo nesses ambientes, a identificação de genótipos com tolerância ao déficit hídrico é imprescindível para se garantir a produção e reduzir prejuízos (Santos et al., 2013), denotando-se a importância dos esforços realizados em programas de melhoramento para a obtenção de plantas com essa característica. Segundo Pereira et al. (2016), os programas de melhoramento voltados para regiões semiáridas têm proporcionado expressiva contribuição para o cultivo de amendoim, pela disponibilização de cultivares precoces e adaptadas às suas peculiaridades climáticas.

No Brasil, o programa de melhoramento do amendoim desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) visa ao desenvolvimento de cultivares adaptadas, tendo a precocidade como um critério adicional adotado na seleção (Santos et al., 2013). Contudo, a obtenção de materiais com tolerância à seca não é uma tarefa simples, o que se deve a vários fatores, entre eles, a estreita base genética da cultura. Assim, por ampliar a base genética da espécie cultivada, a utilização de espécies selvagens de *Arachis* como recurso genético expande as possibilidades de obtenção de cultivares de amendoim com alto potencial econômico (Valls e Simpson, 2005; Leal-Bertioli et al., 2012).

Mesmo com a existência de barreiras cromossômicas, a geração de alotetraploides sintéticos é uma estratégia em uso por vários melhoristas, que visam introgridir genes selvagens de interesse para a espécie cultivada. Ressalte-se o expressivo trabalho desenvolvido por Fávero et al. (2006), cujos alotetraploides de amendoim gerados têm sido utilizados por melhoristas nacionais para expandir a base genética das atuais cultivares em distribuição. Um desses alotetraploides foi cruzado e retrocruzado com a cultivar BR 1, dando origem a população estudada no presente trabalho. Isto amplia expectativas para o uso efetivo

destes recursos genéticos como ferramenta no desenvolvimento do cultivo em regiões com elevado risco climático (Leal-Bertioli et al., 2012).

Para o desenvolvimento de novas cultivares é imprescindível a compreensão dos processos e mecanismos de tolerância das plantas. A tolerância à seca está relacionada a um complexo de eventos que ocorrem em vários níveis celulares, envolvendo alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares (Bhatnagar-Mathur et al., 2009; Pereira et al., 2012; 2016). Por isso, a utilização desses descritores têm sido uma das principais estratégias em programas de melhoramento para auxiliar nos trabalhos de seleção e síntese de novas cultivares com tolerância ao estresse.

Em condições de estresse hídrico, as trocas gasosas podem ser alteradas tanto por limitações difusivas de dióxido de carbono (CO₂), relacionadas com a regulação estomática, como por limitações na atividade dos cloroplastos provocadas pelo desequilíbrio entre captação e utilização de energia luminosa, que causa, dentre outros danos, a fotoinibição (Lisar et al., 2012). Dessa maneira, a avaliação das trocas gasosas e da fluorescência da clorofila *a* representa uma importante ferramenta para o diagnóstico da integridade do aparato fotossintético em detrimento da seca (Silva et al., 2015).

A exposição à fatores de estresse também causam alterações nos mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), desintoxicação e ajustamento osmótico. Nesse contexto, para evitar danos celulares resultantes do excesso de EROs, as plantas contam com mecanismos enzimáticos eficientes de desintoxicação, entre os quais se destaca a atividade da superóxido dismutase (SOD) (Gill e Tuteja, 2010). Por sua vez, o ajustamento osmótico ocorre em função de alterações na síntese e acumulação de compostos orgânicos e inorgânicos, como a prolina. No aspecto molecular, a seca desencadeia várias reações que culminam na expressão de genes relacionados com a tolerância ao estresse (Ding et al., 2014; Nemali e Stephens, 2014), os quais podem ser avaliados utilizando-se de técnicas como a RT-qPCR (*Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*).

No presente estudo foram realizados procedimentos de seleção e validação numa população de alotetraploides de amendoim {BR 1 x [BR 1 x (*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn 2848)^{4x}]} com base na tolerância à seca, utilizando descritores fisiológicos e agronômicos (Capítulo I). Em seguida, alotetraploides de amendoim foram avaliados, em casa de vegetação e campo, focalizando em características moleculares, bioquímicas e agronômicas, com o objetivo de identificar e selecionar plantas com melhor capacidade de se ajustar em condições de estresse hídrico (Capítulo II).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Aspectos gerais da cultura do amendoim

O amendoim é uma planta anual, dicotiledônea, herbácea, com reprodução por meio da autogamia. Pertencente à família Leguminosae, subfamília Faboideae, gênero *Arachis*, seção *Axonomorphae* e série *Amphiploides*, o amendoim possui duas subespécies: *A. hypogaea* L. subesp. *hypogaea*, cujos acessos pertencem ao grupo Virgínia; e *A. hypogaea* L. subsp. *fastigiata*, com os acessos pertencentes aos grupos Valência ou Spanish (Krapovickas e Gregory, 2007). Cada grupo tem sua peculiaridade fenotípica, o que contribui para a distinção dos acessos (Valls, 2013).

Os acessos do grupo Virgínia possuem hábito de crescimento rasteiro, ramificações vegetativas e reprodutivas alternadas nos ramos primários, ciclo longo, ausência de flores no eixo central e vagens com duas sementes; enquanto que os pertencentes aos grupos Valência ou Spanish possuem flores no eixo central, hábito de crescimento ereto, ramificações reprodutivas e vegetativas desordenadas ao longo dos ramos primários, ciclo curto e vagens com duas (Spanish), três ou quatro sementes (Valência) (Valls, 2013). Segundo Santos et al. (2013), várias cultivares comerciais pertencem aos grupos Valência ou Spanish, com valiosos recursos genéticos para o melhoramento voltado para o semiárido.

Os grãos de amendoim são de amplo aproveitamento alimentar, atendendo vários setores de consumo *in natura* ou industrializado, além de serem demandados para o mercado oleoquímico (Melo Filho e Santos, 2010). Esta leguminosa é bastante cultivada no mundo, o que se deve à importância socioeconômica, bem como, a larga adaptação ambiental. A produção de amendoim é superior a 41 milhões de toneladas de grãos e 3,3 milhões de toneladas de óleo, o que a coloca na quinta posição de oleaginosa mais produzida, atrás apenas da soja, colza, do girassol e do algodão (USDA, 2018). O amendoim é cultivado em mais de 100 países, no entanto mais de 90% da produção mundial provém da Ásia e África, sendo China, Índia e Nigéria os maiores produtores mundiais. Na América do Sul, destacam-se Argentina, Brasil, Paraguai, Equador e Bolívia, que juntos produzem mais de 99% da produção do continente (FAO, 2019).

No Brasil, a área total ocupada com a cultura em 2018 foi de, aproximadamente, 152 mil hectares, com produção estimada em 553 mil toneladas de amendoim em casca, o que representa uma produtividade média de 3.616 kg ha⁻¹. Dentre as regiões produtoras, o Sudeste contribui com mais de 90% da produção nacional, com destaque para o Estado de São Paulo

com mais de 502 mil toneladas de amendoim em casca, enquanto as regiões Sul, Centro Oeste e Nordeste contribuem com aproximadamente 6% da produção nacional (IBGE, 2019).

No Nordeste, o amendoim é cultivado em todos os estados, sendo Bahia, Alagoas e Sergipe os principais produtores, com aproximadamente 9 mil toneladas de amendoim em casca, colhidas em pouco mais de 6,7 mil hectares, correspondendo a cerca de 84% da produção regional. No estado da Paraíba pouco mais de 500 hectares são cultivados com a cultura, com produção aproximada de 570 toneladas de amendoim em casca e produtividade média de 1080 kg ha⁻¹ (IBGE, 2018).

A lavoura de amendoim no Nordeste é conduzida, predominantemente, por agricultores de base familiar, que agregam a produção para elevação da renda (Melo Filho e Santos, 2010). As atuais cultivares exploradas nessa região possuem adaptação ambiental e agregam várias características fitossanitárias e nutricionais, tornando a lavoura atraente em função da demanda anual do mercado de grãos (Santos et al., 2013). No entanto, a produtividade é muito inferior à verificada nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, por exemplo, o que pode estar relacionado, principalmente, à ocorrência de períodos secos, também mencionados como veranicos, e à baixa fertilidade dos solos cultivados com a leguminosa.

2.2. Espécies selvagens de *Arachis* e melhoramento do amendoim

O gênero *Arachis*, que pertence à família Leguminosae (Fabaceae), é endêmico da América do Sul (Leal-Bertioli et al., 2015) e possui mais de 80 espécies descritas (Valls e Simpson, 2005; Krapovickas e Gregory, 2007; Valls et al., 2013), sendo a maioria delas diploide ($2n = 2x = 20$). Essas espécies carregam em seu genoma importantes fontes de genes para várias características de interesse em programas de melhoramento do amendoim cultivado (Fávero et al., 2006; 2015; Leal-Bertioli et al., 2012; 2015; 2017).

Várias espécies selvagens de *Arachis* são encontradas em ambientes diversos, variando de pântanos e pastagens, a terra rochosa em condições semiáridas (Krapovickas e Gregory, 2007). Tais espécies, portanto, constituem excelentes recursos genéticos para uso no melhoramento do amendoim voltado para o semiárido, por abrigarem genes que poderiam conferir melhor desempenho em condições hídricas limitadas (Leal-Bertioli et al., 2012). Segundo Fávero et al. (2015), espécies como *A. batizocoi*, *A. gregoryi* e *A. magna* podem ser usadas como genitores femininos e muitas espécies do genoma A (*A. duranensis*, *A. villosa* e *A. stenosperma*) podem ser usadas como genitores masculinos em cruzamentos visando introgridir genes desejáveis no amendoim cultivado.

Por sua vez, a espécie cultivada (*A. hypogaea*) é um tetraploide natural ($2n = 4x = 40$), tendo sua origem associada a possíveis eventos de cruzamento entre espécies diploides, resultando em um híbrido estéril, cujos cromossomos foram duplicados, levando à restauração da fertilidade e provável seleção de controle genético da meiose (Valls, 2013). Com isso, devido à diferença no nível de ploidia, o amendoim tornou-se isolado reprodutivamente de seus parentes selvagens (Leal-Bertioli et al., 2012). Como consequência, a maioria das raças locais é, provavelmente, derivada de uma ou poucas plantas (Valls e Simpson, 2005), levando ao estreitamento da base genética da espécie cultivada ao longo do tempo. Isto tem limitado a exploração da variabilidade genética em programas de melhoramento visando a tolerância à seca, por exemplo, tornando a utilização das espécies selvagens uma importante alternativa para ampliar a base genética e favorecer o melhoramento da cultura (Fávero et al., 2006).

Historicamente, além da barreira de fertilidade causada pela incompatibilidade entre espécies (diferença de ploidia), outras características, como a transferência de genes que controlam características indesejáveis junto aos genes de interesse (*linkage drag*) e as dificuldades em confirmar e rastrear os segmentos introgrididos, também impediu o avanço na utilização de espécies selvagens por cruzamento no melhoramento do amendoim (Leal-Bertioli et al., 2012). Contudo, devido ao valoroso esforço de vários pesquisadores no mundo, avanços significativos foram obtidos no desenvolvimento das ferramentas genéticas necessárias para superar esses problemas, minimizando as dificuldades oriundas da hibridização.

Existem três esquemas de hibridização principais para a introgressão de genes selvagens para o amendoim cultivado (Simpson, 2001). Ao utilizar o esquema de hibridização conhecido como rota tetraploide, Simpson et al. (1993) obtiveram vários alotetraploides sintéticos. Para isso, um diploide com genoma A (neste caso, um híbrido entre *A. cardenasii* e *A. diogoi*) foi cruzado com *A. batizocoi*, dando origem a um híbrido estéril, o qual foi tratado com colchicina para induzir a duplicação dos cromossomos e restaurar a fertilidade.

O alotetraploide resultante [*A. batizocoi* × (*A. cardenasii* × *A. diogoi*)]^{4×} produziu híbridos viáveis quando cruzado com o amendoim cultivado, sendo registrado nos EUA como TxAG-6 (Simpson et al., 1993). A partir deste alotetraploide, várias cultivares importantes foram desenvolvidas por meio de sucessivos retrocruzamentos seguidos de seleção, com destaque para Coan (Simpson e Starr, 2001), NemaTAM (Simpson et al., 2003) e Tifguard

(Holbrook et al., 2008), todas com contribuição genética de espécies selvagens de *Arachis* e liberadas para o cultivo no EUA.

Resultados promissores na introgressão de genes selvagens também foram verificados por pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em parceria com equipe interinstitucional (Fávero et al., 2006; 2015). Utilizando a rota tetraploide de hibridização, Fávero et al. (2006) geraram populações anfídiploides com o intuito de introgreir genes de interesse para a espécie cultivada com vistas ao enriquecimento da base genética.

A partir deste valioso esforço, algumas populações híbridas foram conseguidas, cruzadas com cultivares comerciais, o que gerou diversas combinações com variabilidade para características importantes, como a tolerância a fatores de estresse biótico e abiótico. O uso dessas populações em trabalhos de retrocruzamento e posterior seleção tem sido ampliado, com destaque para os trabalhos realizados pela Embrapa. Atualmente, vários alotetraploides sintéticos de amendoim vêm sendo avaliados quanto à tolerância à seca. Leal-Bertioli et al. (2012) observaram melhora em características morfológicas e fisiológicas de alotetraploides, relacionadas com a tolerância à seca, quando comparadas com cultivares comerciais, o que denota a importância do uso de alotetraploides sintéticos no melhoramento voltado para regiões semiáridas.

2.3. Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas expostas à seca

As plantas possuem inúmeros mecanismos de adaptação às condições de deficiência hídrica do solo, sendo comum a ativação de processos fisiológicos e bioquímicos, os quais estão comumente interligados e com papel efetivo na tolerância à seca. A ativação desses mecanismos está diretamente associada com a espécie, fase fenológica e intensidade do estresse ao qual a planta foi exposta (Lisar et al., 2012).

Portanto, a compreensão do envolvimento das redes fisiológicas e bioquímicas no processo de tolerância à seca é relevante para o desenvolvimento de plantas adaptadas a ambientes com escassez hídrica que possam manter razoáveis rendimentos em condições de déficit hídrico (Nemali e Stephens, 2014). Segundo Nogueira et al. (2013), a utilização de descritores fisiológicos e/ou bioquímicos responsivos ao déficit hídrico pode beneficiar, substancialmente, as estratégias de melhoramento genético voltadas para o semiárido.

2.3.1. Ajustes no metabolismo fotossintético

Entre os processos fisiológicos, um dos mais observados em situações de seca é a regulação estomática, processo pelo qual a planta visa diminuir a perda de água para a atmosfera e, com isso, manter o potencial hídrico necessário para o bom funcionamento do metabolismo celular (Lisar et al., 2012; Silva et al., 2015).

No caso do amendoim, a planta possui mecanismo eficiente de fechamento estomático, que reduz a transpiração antes que a atividade fotossintética seja irreversivelmente danificada, característica de espécies com tolerância à seca (Pereira et al., 2016; Lisar et al., 2012). Em genótipos interespecíficos de *Arachis*, o fechamento estomático na face abaxial da folha reduziu significativamente, em até 89%, a transpiração após nove dias de déficit hídrico no solo (Azevedo Neto et al., 2010). De maneira semelhante, Pereira et al. (2016) verificaram correlação negativa entre a resistência difusiva e a transpiração em genótipos de amendoim expostos à seca, evidenciando o papel efetivo da regulação estomática na prevenção da perda de água em condições de baixa disponibilidade hídrica.

Outra resposta comum em condições de estresse hídrico é a limitação na assimilação de carbono, que pode estar relacionada com o processo de regulação estomática, descrito anteriormente, ou com outros fatores não estomáticos, como por exemplo, a manutenção da integridade dos fotossistemas (Lisar et al., 2012). Avaliando várias características fisiológicas em genótipos de amendoim sob déficit hídrico, Kalariya et al. (2015) verificaram que a assimilação líquida de CO₂ (P_n) foi diretamente associada ao fechamento estomático, principalmente por limitar o influxo de dióxido de carbono na folha, bem como ao *quenching* não fotoquímico (NPQ), o qual está diretamente relacionado com a proteção dos fotossistemas, eliminando o excesso de energia luminosa interceptada.

2.3.2. Aumento da acumulação de osmólitos

No aspecto bioquímico, dentre as respostas adaptativas mais importantes para tolerância ao estresse, destaca-se o ajustamento osmótico (Ashraf e Foolad, 2007; Lisar et al., 2012). Segundo Ashraf e Foolad (2007), em condições de estresse hídrico, as plantas podem aumentar a produção e acúmulo de vários osmólitos orgânicos e inorgânicos, em processo chamado de regulação osmótica. Com isso, processos importantes como alongamento celular e absorção de água são mantidos, mesmo em condições de déficit hídrico. Como consequência, a condutância estomática é sustentada, proporcionando maximização do processo fotossintético e, conseqüentemente, maior produção (Ashraf e Foolad, 2007).

Entre os compostos orgânicos envolvidos na regulação osmótica, destacam-se prolina, glicina betaína, trealose e alcoóis de açúcar (sorbitol e manitol). Estes solutos, geralmente, não interferem no metabolismo celular, tendo como principal função a manutenção da turgidez em potenciais hídricos negativos. Em adição, outras funções são observadas para tais solutos, entre elas proteção de enzimas, estruturas e integridade de membranas, eliminação de radicais livres e estabilização de macromoléculas (Ashraf e Foolad, 2007; Lissar et al., 2012).

Avaliando genótipos de amendoim tolerantes e suscetíveis à seca, Bhatnagar-Mathur et al. (2009) verificaram aumento expressivo do conteúdo de prolina livre nas plantas tolerantes com redução do potencial hídrico, ao contrário do que foi observado nas plantas suscetíveis. Comportamento semelhante foi observado por Pereira et al. (2012), ao avaliarem alterações bioquímicas em diferentes genótipos de amendoim submetidos ao déficit hídrico moderado, sendo registrados aumentos de 105% e 49% no conteúdo de prolina livre das cultivares tolerantes Senegal 55-437 e BR 1, respectivamente. Por outro lado, com supressão hídrica de 10 dias, foi verificado maior acúmulo de prolina livre nas folhas do genótipo sensível (LViPE-06) (Pereira et al., 2016). Isso evidencia que o papel da prolina na tolerância de amendoim ainda não está totalmente elucidado, denotando-se a necessidade de mais estudos visando entender o mecanismo de acumulação e o respectivo efeito na tolerância à seca (Borgo et al., 2015).

2.3.3. Incremento na capacidade antioxidativa

Em condições ótimas de cultivo há baixa geração de EROs nos compartimentos celulares vegetais (Gill e Tuteja, 2010). Contudo, a exposição a fatores de estresse ambiental pode aumentar a produção de EROs, tais como oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) (Lissar et al., 2012; Barbosa et al., 2014).

As EROs exercem papéis divergentes nas plantas. Em baixas concentrações, atuam como moléculas sinalizadoras mediando vários processos celulares, incluindo alterações desencadeadas pela exposição a fatores de estresse ambiental, enquanto que em altas concentrações podem causar danos graves aos componentes celulares (Lissar et al., 2012; Barbosa et al., 2014). Em altas concentrações, as EROs comumente causam danos em aminoácidos, lipídeos, proteínas e no DNA, o que leva a alterações intrínsecas nas propriedades das membranas e, em estágio mais avançado, a morte celular (Gill e Tuteja, 2010). Desta forma, o equilíbrio entre a formação e a remoção de EROs é essencial para o

bom funcionamento das células vegetais, especialmente quando expostas a condições de estresse hídrico (Barbosa et al., 2014).

Para evitar ou minimizar danos oxidativos, as plantas possuem um complexo sistema antioxidativo de defesa composto por componentes não enzimáticos e enzimáticos capazes de neutralizar a citotoxicidade das EROs. Entre os componentes não enzimáticos, destacam-se o ascorbato, a glutatona, os carotenoides, o α -tocoferol e outros compostos fenólicos (Gill e Tuteja, 2010). Por outro lado, o mecanismo enzimático de desintoxicação envolve a indução de enzimas, entre elas a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX) e a glutatona redutase (GR) (Barbosa et al., 2014).

Em plantas de amendoim cultivadas sob déficit hídrico, Bhatnagar-Mathur et al. (2009) verificaram incremento na atividade antioxidativa da SOD, APX e GR, especialmente para o genótipo tolerante, com redução da concentração de EROs e, conseqüentemente, da peroxidação de lipídeos, para esses genótipos. Pereira et al. (2012) também reportaram incrementos na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX) em folhas e raízes de genótipos de amendoim tolerantes ao déficit hídrico (Senegal 55-437 e BR 1) quando a disponibilidade hídrica foi reduzida, ao contrário do que foi observado nos genótipos sensíveis. Tais resultados podem ser indicativos de que o aumento da atividade antioxidante tem uma relação estreita com a tolerância à seca em amendoim, corroborando com Zhang et al. (2015) que verificaram correlação positiva entre atividade da SOD e coeficiente de tolerância à seca em diferentes genótipos de amendoim.

2.4. Alterações moleculares em condições de estresse hídrico

Quando expostas ao estresse hídrico, as plantas passam por uma série de modificações celulares que, por sua vez, resultam em mudanças fenotípicas que permitem mitigar os efeitos da seca. Em nível molecular, a modificação em condições de déficit é a percepção do sinal por receptores específicos, geralmente encontrados em membranas da célula; em seguida, o sinal é transferido para o núcleo, um processo conhecido por transdução de sinal; a chegada do sinal de estresse no núcleo celular resulta em aumento ou redução da expressão de genes relacionados com a seca (Nemali e Stephens, 2014).

Embora as alterações moleculares sejam conhecidas, os mecanismos envolvidos ainda não são completamente elucidados, especialmente para a cultura do amendoim (Ding et al., 2014). Contudo, progressos recentes obtidos na genômica facilitaram a compreensão de parte dos mecanismos envolvidos com a tolerância a fatores de estresse abiótico em plantas,

resultando na identificação de vários genes envolvidos na tolerância à seca (Brasileiro et al., 2015). Com isso, o desenvolvimento de plantas com maior tolerância à seca tornou-se mais viável, graças à possibilidade de utilização de genes que ativam ou modulam mecanismos específicos, melhorando a capacidade da planta em suportar condições de cultivo com limitação hídrica (Vinson et al., 2018).

Entre os avanços mais significativos da genômica nos últimos tempos, destacam-se o desenvolvimento de marcadores moleculares, a construção de mapas genéticos e a análise de locos de características quantitativas (QTL) (Desmae et al., 2018). Outro avanço significativo na genômica do amendoim tem sido a liberação do sequenciamento do genoma dos possíveis progenitores do amendoim, *A. duranensis* (genitor do genoma A) e *A. ipaensis* (genitor do genoma B) (Bertioli et al., 2016). No entanto, o papel biológico de muitos genes induzidos pelo déficit hídrico que participam dos mecanismos de resposta do amendoim à seca ainda são desconhecidos (Vinson et al., 2018).

Por sua vez, a avaliação do perfil de expressão gênica de espécies selvagens de *Arachis* submetidas ao déficit hídrico, possibilitou a identificação de genes associados aos principais processos relacionados à tolerância das plantas às condições de seca, como os envolvidos na transdução de sinais, metabolismo primário, homeostase hormonal e adaptação/proteção de estruturas celulares (Brasileiro et al., 2015; Vinson et al., 2018). Nestes mecanismos reguladores moleculares estão incluídos a produção de osmoprotetores, antioxidantes e hormônios, como o ácido abscísico (ABA) e etileno (ET), a atuarem como moléculas sinalizadoras que ligam as redes transcricionais de tolerância à seca (Vinson et al., 2018). Ding et al. (2014) construíram uma biblioteca de cDNA, utilizando a técnica de Hibridização Subtrativa por Supressão (SSH cDNA library), e identificaram vários genes responsivos ao estresse hídrico em plantas de amendoim. Entre os genes identificados encontram-se os que codificam a síntese de osmólitos (prolina, galactinol e rafinose) e enzimas antioxidativas (SOD).

Tais conhecimentos reforçam a importância de estudos detalhados sobre a tolerância à seca em amendoim, visando à elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos, assim como, a identificação de novos genes chave que possam ser utilizados para o aumento da tolerância ao estresse. Além disso, a realização de estudos com essa temática gera subsídios para o melhoramento do amendoim utilizando técnicas de engenharia genética, as quais necessitam de conhecimento prévio sobre os genes envolvidos com a tolerância à seca (Ding et al., 2014).

3. REFERÊNCIAS

- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental Experimental Botany**, v.59, p.206-216, 2007.
- AZEVEDO NETO, A. D.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; MELO FILHO P. A.; SANTOS, R. C. Physiological and biochemical responses of peanut genotypes to water deficit. **Journal of Plant Interactions**, v.5, p.1-10, 2010.
- BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciências Agrárias**, v.44, p.453-460, 2014.
- BERTIOLI, D. J.; CANNON, S. B.; FROENICKE, L.; HUANG, G.; FARMER, A. D.; CANNON, E. K. S.; LIU, X.; GAO, D.; CLEVINGER, J.; DASH, S.; REN, L.; MORETZSOHN, M. C.; SHIRASAWA, K.; HUANG, W.; VIDIGAL, B.; ABERNATHY, B.; CHU, Y.; NIEDERHUTH, C. E.; UMALE, P.; ARAÚJO, A. C. G.; KOZIK, A.; KIM, K. D.; BUROW, M. D.; VARSHNEY, R. K.; WANG, X.; ZHANG, X.; BARKLEY, N.; GUIMARÃES P. M.; ISOBE, S.; GUO, B.; LIAO, B.; STALKER, H. T.; SCHMITZ, R. J.; SCHEFFLER, B. E.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; XUN, X.; JACKSON, S. A.; MICHELMORE, R.; OZIAS-AKINS, P. The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. **Nature Genetics**, v.48, p.438-449, 2016.
- BHATNAGAR-MATHUR, P.; DEVI, M. J.; VADES, V.; SHARMA, K. K. Differential antioxidative responses in transgenic peanut bean on relationship to their superior transpiration efficiency under drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v.166, p.1207-1227, 2009.
- BORGIO, L.; MARUR, C. J.; VIEIRA, L. G. E. Effects of high proline accumulation on chloroplast and mitochondrial ultrastructure and on osmotic adjustment in tobacco plants. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.37, p.191-199, 2015.

BRASILEIRO, A. C. M.; MORGANTE, C. V.; ARAUJO, A. C. G.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; SILVA, A. K.; MARTINS, A. C. Q.; VINSON, C. V.; SANTOS, C. M. R.; BONFIM, O.; TOGAWA, R. C.; SARAIVA, M. A. P.; BERTIOLI, D. J.; GUIMARÃES, P. M. Transcriptome profiling of wild *Arachis* from water-limited environments uncovers drought tolerance candidate genes. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.33, p.1876-1892, 2015.

DESMAR, H.; JANILA, P.; OKORI, P.; PANDEY, M. K.; MOTAGI, B. N.; MONYO, E.; MPONDA, O.; OKELLO, D.; SAKO, D.; ECHECKWU, C.; OTENG-FRIMPONG, R.; MININGOU, A.; OJIEWO, C.; VARSHNEY, R. K. Genetics, genomics and breeding of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Plant Breeding**, v.2018, p.1-20, 2018.

DING, H.; ZHANG, Z. M.; QIN, F. F.; DAI, L. X.; LI, C. J.; CI, D. W.; SONG, W. W. Isolation and characterization of drought-responsive genes from peanut roots by suppression subtractive hybridization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.17, p.304-310, 2014.

FAO. Food and Agricultural Organization of the United Nations. **FAOSTAT**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 12 de abr. 2019.

FÁVERO, A. P.; SIMPSON, C. E.; VALLS, J. F. M.; VELLO, N. A. Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaensis*, *A. duranensis*, and *A. hypogaea*. **Crop Science**, v.46, p.1546-1552, 2006.

FÁVERO, A. P.; SANTOS, R. F.; SIMPSON, C. E.; VALLS, J. F. M.; VELLO, N. A. Successful crosses between fungal-resistant wild species of *Arachis* (section *Arachis*) and *Arachis hypogaea*. **Genetics and Molecular Biology**, v.38, p.353-365, 2015.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p.909-930, 2010.

HOLBROOK, C. C.; TIMPER, P.; CULBREATH, A. K.; KVIEN, C. K. Registration of 'Tifguard' peanut. **Journal of Plant Registration**, v.2, p.92-94, 2008.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da Produção Agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?edicao=22770&t=resultados>. Acesso em 12 de abr. 2019.

KALARIYA, K. A.; SINGH, A. L.; GOSWAMI, N.; MEHTA, D.; MAHATMA, M. K.; JAY, B. C.; CHAKRABORTY, K.; ZALA, P. V.; CHAUDHARY, V.; PATEL, C. B. Photosynthetic characteristics of peanut genotypes under excess and deficit irrigation during summer. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.21, p.317-327, 2015.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomy of the genus *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v.16 (Supl.), p.1-205, 2007.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; BERTIOLI, D. J.; GUIMARÃES, P. M.; PEREIRA, T. D.; GALHARDO, I.; SILVA, J. P.; BRASILEIRO, A. C. M.; OLIVEIRA, R. S.; SILVA, P. I. T.; VADEZ, V.; ARAÚJO, A. C. G. The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits. **Environmental and Experimental Botany**, v.84, p.17-24, 2012.

LEAL-BERTIOLI, S.C.M.; SANTOS, S. P.; DANTAS, K. M.; INGLIS, P. W.; NIELEN, S.; ARAÚJO, A. C. G.; SILVA, J. P.; CAVALCANTE, U.; GUIMARÃES, P. M.; BRASILEIRO, A. C. M.; CARRASQUILLA-GARCIA, N.; PENMETSA, R. V.; COOK, D.; MORETZSOHN, M. C.; BERTIOLI, D. J. *Arachis batizocoi*: a study of its relationship to cultivated peanut (*A. hypogaea*) and its potential for introgression of wild genes into the peanut crop using induced allotetraploids. **Annals of Botany**, v.115, p.237-249, 2015.

LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; MORETZSOHN, M. C.; SANTOS, S. P.; BRASILEIRO, A. C. M.; GUIMARÃES, P. M.; BERTIOLI, D. J.; ARAÚJO, A. C. G. Phenotypic effects of allotetraploidization of wild *Arachis* and their implications for peanut domestication. **American Journal of Botany**, v.104, p.379-388, 2017.

LISAR, S. Y. S.; MOTAFAKKERAZAD, R.; HOSSAIN, M. M.; RAHMAN, I. M. M. Water stress in plants: causes, effects and responses. In: RAHMAN, I. M. M, **Water Stress**, Rijeka: INTECH, 2012. p.1-14.

MELO FILHO, P. A.; SANTOS, R. C. A cultura do amendoim no Nordeste: situação atual e perspectivas. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v.27, p.192-208, 2010.

NEMALI, K.; STEPHENS, M. Plant abiotic stress: water. **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**, v.4, p.335-342, 2014.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; TÁVORA, F. J. A. F.; ALBUQUERQUE, M. B.; NASCIMENTO, H. H. C.; SANTOS, R. C. Ecofisiologia do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In: SANTOS, R. C.; FREIRE, R. M. M.; LIMA, L. M. (Eds.), **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2013, p.72-113.

PEREIRA, J. W. L.; MELO FILHO, P. A.; ALBURQUERQUE, M. B.; NOGUEIRA, R. J. M. E.; SANTOS, R. C. Mudanças bioquímicas em genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico moderado. **Ciência Agronômica**, v.43, p.766-773, 2012.

PEREIRA, J. W. L.; ALBUQUERQUE, M. B., MELO FILHO, P. A.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; LIMA, L. M.; SANTOS, R. C. Assessment of drought tolerance of peanut cultivars based on physiological and yield traits in a semiarid environment. **Agricultural Water Management**, v.166, p.70-76, 2016.

SANTOS, R. C.; GODOY, I. J.; FÁVERO, A. P. Melhoramento do amendoim e cultivares comerciais. In: SANTOS, R. C.; FREIRE, R. M. M.; LIMA, L. M. (Eds.), **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2013. p.117-184.

SILVA, F. G.; DUTRA, W. F.; DUTRA, A. F.; OLIVEIRA, I. M.; FILGUEIRAS, L. M. B.; MELO, A. S. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em plantas de berinjela sob lâminas de irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.19, p.946-952, 2015.

SIMPSON, C. E.; NELSON, S. C.; STARR, J. L.; WOODARD, K. E.; SMITH, O. D. Registration of TxAG-6 and TxAG-7 peanut germplasm lines. **Crop Science**, v.33, p.1418, 1993.

SIMPSON, C. E.; STARR, J. L. Registration of ‘Coan’ peanut. **Crop Science**, n.41, p.918-920, 2001.

SIMPSON, C. E. Use of wild *Arachis* species/introgression of genes into *A. hypogaea* L. **Peanut Science**, v.28, p.114-116, 2001.

SIMPSON, C. E.; STARR, J. L.; CHURCH, G. T.; BURROW, M. D.; PATERSON, H. A. Registration of NemaTAM peanut. **Crop Science**, v.43, p.1561, 2003.

USDA. United States Department of Agriculture. **Oilseeds: world markets and trade**. Foreign Agricultural Service, 39p., february 2019.

VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. New species of *Arachis* (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, v.14, p.35-64, 2005.

VALLS, J. F. M. Recursos genéticos do gênero *Arachis*. In: SANTOS, R. C.; FREIRE, R. M. M.; LIMA, L. M. (Eds.), **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2013. p.45-69.

VALLS, J. F. M.; COSTA, L. C.; CUSTÓDIO, A. R. A novel trifoliate species of *Arachis* (Fabaceae) and further comments on the taxonomic section *Trirectoides*. **Bonplandia**, v.22, p.91-97, 2013.

VINSON, C. C.; MOTA, A. P. Z.; OLIVEIRA, T. N.; GUIMARÃES, L. A.; LEAL-BERTIOLI, S. C. M.; WILLIAMS, T. C. R.; NEPOMUCENO, A. L.; SARAIVA, M. A.; ARAUJO, A. C. G.; GUIMARÃES, P. M.; BRASILEIRO, A. C. M. Early responses to dehydration in contrasting wild *Arachis* species. **Plos One**, v.13, e0198191, 2018.

ZHANG, X.; WAN, Q.; LIN, F.; ZHANG, K.; SUN, A.; LUO, B.; SUN, L.; WAN, Y. Molecular analysis of the chloroplast Cu/Zn-SOD gene (AhCSD2) in peanut. **The Crop Journal**, v.3, p.246-257, 2015.

CAPÍTULO I

INTROGRESSION OF WILD ALLELES INTO THE TETRAPLOID PEANUT CROP TO IMPROVE WATER USE EFFICIENCY, EARLINESS AND YIELD

Artigo publicado na revista Plos One (v.13, n.3, e0198776, 2018)

4. INTROGRESSION OF WILD ALLELES INTO THE TETRAPLOID PEANUT CROP TO IMPROVE WATER USE EFFICIENCY, EARLINESS AND YIELD

Wellison F. Dutra¹, Yrlânia L. Guerra², Jean P.C. Ramos¹, Pedro D. Fernandes³, Carliane R.C. Silva², David J. Bertoli⁴, Soraya C. M. Leal-Bertoli⁵, Roseane C. Santos²

¹Federal University of Paraíba, Agronomy Pos-Graduation, Rodovia PB 079, km 12, CEP 58397-000, Areia-PB, Brazil.

²Laboratory of Biotechnology, Embrapa Cotton, Rua Osvaldo Cruz, nº 1143, Centenário, CEP 58428-095, Campina Grande-PB, Brazil.

³State University of Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Rua Baraúnas, nº 351, Universitário, CEP 58429-500, Campina Grande-PB, Brazil.

⁴Crop and Soil Science Department/Center for Applied Genetic Technologies, University of Georgia, 111, Riverbend Rd, Athens, GA 30602

⁵Plant Pathology Department/Center for Applied Genetic Technologies, University of Georgia, 111, Riverbend Rd, Athens, GA 30602

Short title: Wild alleles improve peanut water use efficiency, earliness and yield

Abstract

The introduction of genes from wild species is a practice little adopted by breeders for the improvement of commercial crops, although it represents an excellent opportunity to enrich the genetic basis and create new cultivars. In peanut, this practice is being increasingly adopted. In this study we present results of introgression of wild alleles from the wild species *Arachis duranensis* and *A. batizocoi* improving photosynthetic traits and yield in a set of lines derived from the cross of an induced allotetraploid and cultivated peanut with selection under water stress. The assays were carried out in greenhouse and field focusing on physiological and agronomic traits. A multivariate model (UPGMA) was adopted in order to classify drought tolerant lines. Several lines showed improved levels of tolerance, with values similar to or greater than the tolerant control. Two BC₁F₆ lines (53 P4 and 96 P9) were highlighted for good drought-related traits, earliness and pod yield, having better phenotypic profile to the drought tolerant elite commercial cultivar BR1. These lines are good candidates for the creation of peanut cultivars suitable for production in semiarid environments.

Keywords

Peanut, drought tolerance, wild *Arachis*, gas exchange, chlorophyll fluorescence, photosynthetic efficiency, water use efficiency, earliness, yield, introgression, allotetraploid, stomatal conductance, germplasm.

Resumo

A introdução de genes de espécies silvestres é uma prática pouco adotada por melhoristas para o melhoramento das culturas comerciais, embora represente uma excelente oportunidade para enriquecer a base genética e criar novas cultivares. No amendoim, esta prática está sendo cada vez mais adotada. Neste estudo apresenta-se resultados da introgressão de alelos selvagens das espécies selvagens *Arachis duranensis* e *A. batizocoi*, melhorando as características fotossintéticas e o rendimento em linhas derivadas do cruzamento de um alotetraploide induzido e o amendoim cultivado, com seleção sob estresse hídrico. Os ensaios foram realizados em casa de vegetação e campo focalizando em características fisiológicas e agronômicas. O modelo multivariado (UPGMA) foi adotado para classificar linhas tolerantes à seca. Várias linhas apresentaram melhores níveis de tolerância, com valores semelhantes ou superiores ao controle tolerante. Duas linhas BC₁F₆ (53 P4 e 96 P9) se destacaram quanto às características relacionadas à seca, precocidade e produção de vagens, tendo bom perfil fenotípico, comparado com a cultivar comercial tolerante à seca BR1. Essas linhas são boas candidatas para o desenvolvimento de cultivares de amendoim adequadas para o cultivo em ambientes semiáridos.

Palavras-chave

Amendoim, tolerância à seca, *Arachis* silvestres, trocas gasosas, fluorescência da clorofila, eficiência fotossintética, eficiência do uso da água, precocidade, produtividade, introgressão, alotetraploide, condutância estomática, germoplasma.

Abbreviations

CO₂ - carbon dioxide, g_s - stomatal conductance, E - transpiration rate, P_N - net photosynthetic rate, C_i - intercellular CO₂ concentration, P_N/C_i - instantaneous carboxylation efficiency, WUE - instantaneous water use efficiency, NPQ - non-photochemical quenching.

4.1. Introduction

Drought is a widespread environmental phenomenon with particularly damaging social and economic consequences in arid and semiarid environments. The development of plant cultivars adapted to environments prone to drought is a valuable strategy in improvement programs and a great challenge due to complex genetic inheritance [1]. Drought response involves cascades of events with consequences in biochemistry, physiology, and phenotype [2, 3]. To simplify the process of selection, breeders can use surrogate traits in order to assist the identification of plants tolerant to drought.

Plants under water stress have altered gas exchange due to diffusive limitations of CO₂, which decreases carboxylation efficiency, or due to limitations of chloroplast activity caused by photo inhibition [2]. Several protective mechanisms have been developed by plants in order to balance absorbed light energy with photosynthesis. According to Kalariya et al. [4], non-photochemical quenching (NPQ) is a very important trait, which refers to non-photochemical releasing of excess energy through the chloroplasts, protecting the photosynthetic apparatus. Gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence are very sensitive indicators of physiological status of leaves and plant performance in a wide range of situations [2, 5]. They reveal the current state of the photosynthetic metabolism, including the status of damage and repair under stress conditions [4, 5].

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is an important oilseed cultivated in many countries, to attend grain and oil markets. The genus *Arachis* has over 80, mostly diploid ($2n = 2x = 20$) species, which represent valuable genetic resources with wide adaptation to tropical and semiarid environments [6, 7]. The use of wild species of *Arachis* in improvement programs has been limited, mainly due ploidy differences and chromosomic barriers among the species. This can be overcome by artificial hybridizing A and B genome wild species followed by induced chromosome duplication to restore fertility and the tetraploid state [8]. The development of synthetic lines by combining A and B genomes, has provided a range of tetraploids possessing several good traits, such as resistance to diseases and insect pests, and opened new opportunities for peanut improvement [9-12]. Varieties such as ‘Tamnut 74’ [13], ‘Coan’ [14], ‘NemaTAM’ [15], ‘Tifguard’ [16] and Bailey [17] that have a genetic contribution from wild *Arachis* species, were released for cultivation in the USA.

In Brazil, introgression efforts were initiated in 2000, by a multidisciplinary team of EMBRAPA (Brazilian Agricultural Research Corporation), in collaboration with other national and international institutions, focusing on obtaining synthetic allotetraploid lines resistant to foliar diseases. Currently, several synthetics allotetraploid are available and are

being evaluated for drought tolerance [11, 18, 19]. Robust commercial cultivars are being used as parents in crossbreeding work. Recently, three commercial cultivars were released in Senegal with improved disease resistance and yield [20].

In this work, we report the development of breeding lines derived from the cross between *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* cv. BR1, widely grown in Brazilian semiarid region due to broad environmental adaptation [21], and the induced allotetraploid (*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn 2848)^{4x} [11]. The parent *A. duranensis* SeSn 2848 was originally found in a semi-arid region of Argentina, and was found to have conservative transpiration behavior, that could be advantageous for introgression. Lines had improved drought-related traits, such as water use efficiency, high productivity, and early flowering, all desirable traits for cultivation in areas of low water availability.

4.2. Material and methods

4.2.1. Plant material

A. hypogaea subsp. *fastigiata* var. *fastigiata* cv. BR1 (here called BR1) is an early-upright cultivar widely adapted to tropical and semiarid environments [3, 21]. It was chosen as a parent due to high ability to produce mature pods even with low water availability, both intermittent and end of season [22]. The induced allotetraploid [*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn2848]^{4x} (here called BatDur), was produced using wild accessions from the *Arachis*-germplasm bank at EMBRAPA Genetic Resources and Biotechnology [11]. BR1 and BatDur were crossed and F₂ progeny from this hybrid were backcrossed with BR1. BC₁F₁s were selfed, generating 281 seeds. BC₁F₂ plants were grown in green house (Recife, 8°03'14"S 34°52'51"W, 7m), seeds were sown in 20L pots containing sandy-loam textured soil previously limed and fertilized (NPK, 20:60:30, ammonium sulfate, single superphosphate and potassium chloride). Twenty-five days after germination, plants were submitted to water withdrawal for 15 days. Only 87 reached full cycle, and among them 13 were selected based on harvest index (HI ≥ 35%) and drought tolerance index (DTI ≥ 0.7) (S1 Appendix). HI was estimated based on pod yield/total plant dry weight ratio [23], and DTI was estimated through pod yield under stressed treatment/pod yield under control treatment ratio [24]. As all progenies were submitted to stress, the mean of BR1 was used as control. Ten BC₁F₃ seeds from each of the 13 selected plants were selected for further field assays. A summary of the selection steps of all procedures is found in Fig 1.

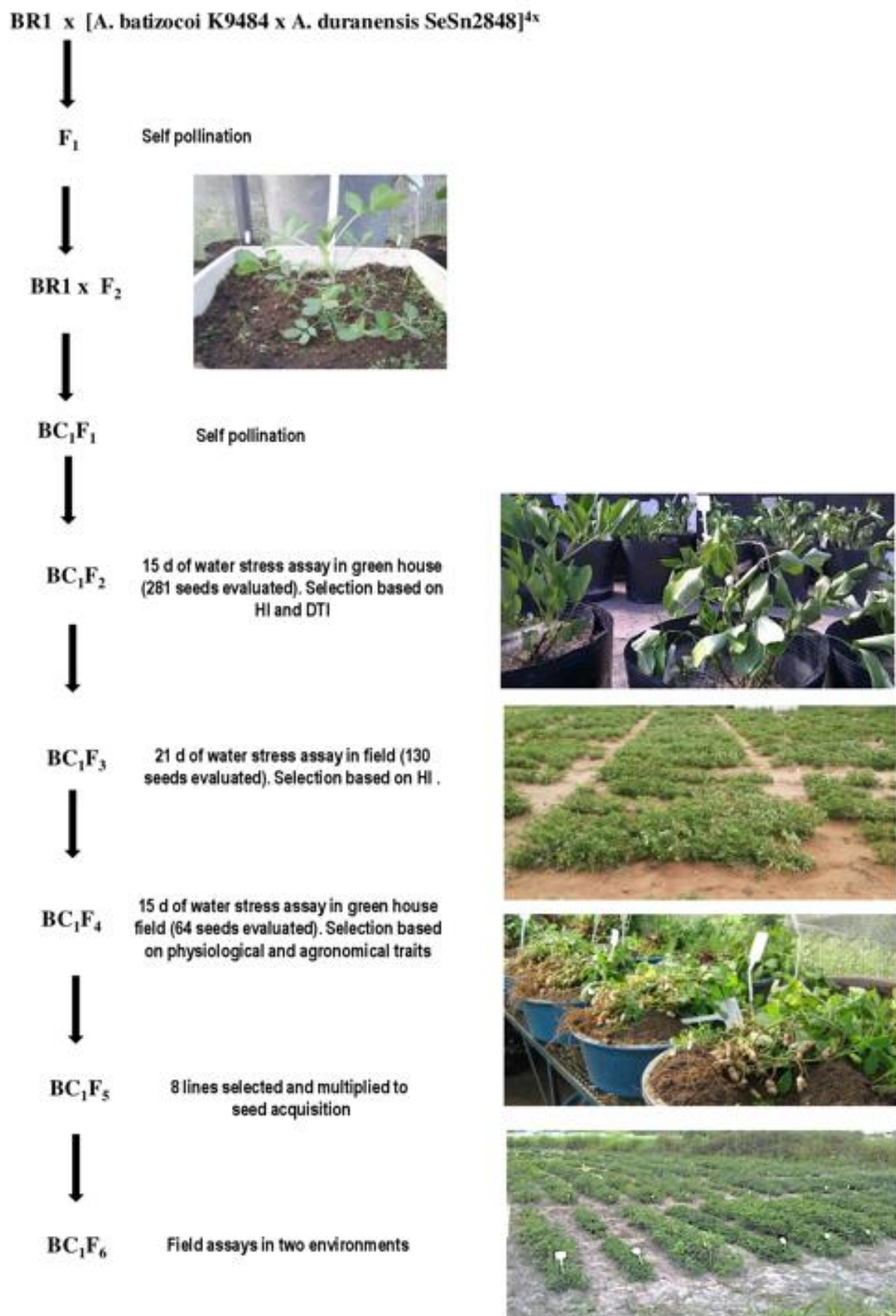


Figure 1. Summary of the selection steps adopted in breeding of induced allotetraploid BatDur.

4.2.2. Initial field selection and physiological assays in green house

One hundred and thirty BC₁F₃ seeds were grown in field trial (Campina Grande, PB, 7°13'50"S, 35°52'52"W, 551 m, semiarid climate), during end of rainy season 2015 (July-October). Plants were sown in 5m-rows, spaced 30 cm, and after 25 days of plant emergence submitted to 21 days of water withdrawal . Thereafter, the irrigation was restored, maintaining watering equivalent to 400 mm during the growing cycle [25]. Crop management was followed according to Santos et al. [26]. At harvest, 64 out of the initial 130 plants were selected based on harvest index ($HI \geq 30\%$) (S1 Appendix).

Progeny from the 64 BC₁F₃ plants selected were evaluated for physiological responses associated to drought tolerance and agronomical traits. Plants were grown in greenhouse, in Campina Grande, PB, during the dry season (Oct/2015-Feb/2016). BC₁F₄ plant seeds were sown in 30L pots containing sandy-loam textured soil previously limed and fertilized (NPK, 20:60:30, ammonium sulfate, single superphosphate and potassium chloride). Three cultivated genotypes were added to the assay: BR1 (Valencia-upright, tolerant to drought), Senegal 55-437 (Spanish-upright, tolerant to drought), and LViPE-06 (Virginia-runner, sensitive to drought) [3, 21, 22]. Plants were watered daily, maintaining field capacity, determined by gravimetric method after 72 h of draining [3]. At anthesis (24-25 days for upright cultivars and 34-35 days for runner LViPE-06) plants were submitted to 15 day of water restriction. Water replacement was based on crop evapotranspiration (ETC), estimated by an evaporation tank installed inside the greenhouse and the peanut crop coefficient [27]. The temperatures recorded during the assay, ranged between 18°C and 44°C. The relative humidity of the air was, on average, 68%.

An incomplete randomized block was adopted with 10 replicates. The following physiological traits were measured: stomatal conductance (g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹), transpiration rate (E , mmol H₂O m⁻² s⁻¹), net photosynthetic rate (P_N , μmol m⁻² s⁻¹) and intercellular CO₂ concentration (C_i , μmol m⁻² s⁻¹). Based on these data, we estimated instantaneous carboxylation efficiency (P_N/C_i) and instantaneous water use efficiency (WUE, (μmol m⁻² s⁻¹)/(mmol H₂O m⁻² s⁻¹)), as the ratio P_N/E [28]. Data were collected from mid canopy fully expanded leaves, between 9:00 and 11:00 AM using an infrared gas analyzer (IRGA, ACD, LCPro SD, UK), coupled with light source at 1600 μmol m⁻² s⁻¹. Modulated chlorophyll fluorescence traits were estimated by Fluorometer OS5p (Opti-Sciences, Hudson, USA). Non-photochemical quenching (NPQ) was evaluated following methodology described in Kramer et al. [29].

Data were analyzed through uni and multivariate (non-hierarchical model) methods, using software GENES 2013.5.1 [30]. The UPGMA method was adopted as non-hierarchical model. A cophenetic correlation coefficient was estimated in order to adjust the model [31]. The Euclidean distance between the points representing the genotypes was used as a measure of relatedness [32].

4.2.3. Validation of tolerant genotypes in field conditions

Based on the dendrogram generated by UPGMA using physiological data (Fig 2), a 30%-selection was applied in plants clustered in same group of drought-tolerant cultivars (BR1 or Senegal 55-437). The seeds (BC_1F_5) of each plant were multiplied in Campina Grande, PB, under normal watering, between February and May 2016, adopting the same methodology as described before, for further use in validation assays.

BC_1F_6 lines were grown in the field, in a mid-sandy Entisol, in Lagoa Seca, PB (7°08'15.74"S, 35°50'20.05"W, 602 m, semiarid climate) during rainy season 2016 (May-Sep), and in a mid-sandy Vertisol, in Campina Grande, PB, during rainy season (May-Aug, 2017). Soil of both places were previously limed (2t ha⁻¹ dolomitic limestone) and fertilized (NPK, 20:60:30, ammonium sulfate, single superphosphate and potassium chloride). BR1 was used as control.

Each genotype was sown in one row (5 m length), spaced in 70 cm each. The density in each row was five plants/meter. A randomized complete block design was adopted with three replications. The crop management was followed according recommendations described in Santos et al. [26]. Data of first flowering was recorded at the beginning of reproductive phase of each line. At harvest, plants were maintained in the field for one week, for complete drying. Then, each genotype was evaluated for: number of pods per plant, number of seed per pod and pod yield (kg ha⁻¹). Statistical analyses were done using software GENES, version 2013.5.1. [30]. *F* test was adopted to variance analysis. Means were compared by Tukey test.

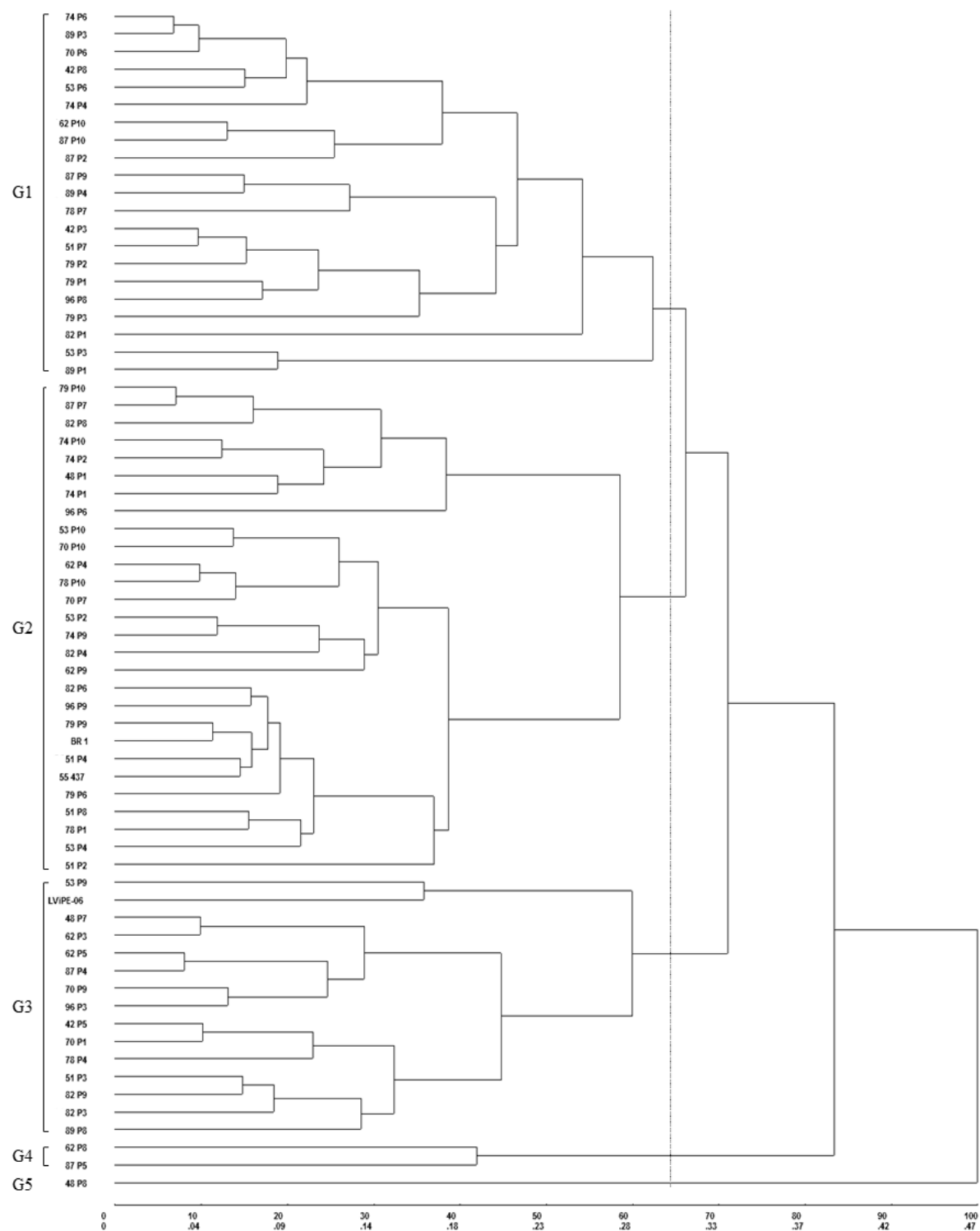


Figure 2. Dendrogram obtained by UPGMA using 64 BC1F4 lines, based on physiological traits (gs, E, PN, Ci, PN/Ci, WUE, and NPQ). Coefficient of cophenetic correlation: 0.70 ($p < 0.01$). Selection of groups based on genetic dissimilarity index (64.4%). G - Group.

4.3. Results and discussion

4.3.1. Initial selection procedures and clustering analysis

In this study, we aimed to produce breeding advanced lines, introgressing wild alleles from *A. duranensis* and *A. batizocoi* to improve peanut drought tolerance. An *A. batizocoi* x *A. duranensis* induced allotetraploid was crossed with a local elite drought tolerant cultivar, BR1. The F₂ generation, obtained from this cross was backcrossed with BR1 and, from BC₁F₂ on, assays were carried out in green house and field in order to identify plants tolerant to drought. The rationale for using this approach was based mainly on *Arachis duranensis* being identified as a potentially good donor of alleles for drought tolerance. Leal-Bertioli et al. [1], carried out a study involving the effect of tetraploidization of wild *Arachis* on drought-related traits, and found an *A. duranensis* accession with conservative transpiration profile under water limited conditions. An induced allotetraploid was produced using this accession [11] and many anatomical and physiological traits were changed after tetraploidization [19]. However, the conservative transpiration profile was also present in the derived allotetraploid (data not shown). According to Brasileiro et al [33], transcriptome profiling of wild *Arachis* under water-limited environments, leaves and roots of *A. duranensis* revealed several transcripts involved with drought tolerance, such as Expansin, Nitrilase, NAC, and bZIP transcription factors. *A. duranensis* is a diploid wild annual species, native to low rainfall regions in Bolivia and Argentina, adapted to intermittent drought spells [1, 6] and in the present study, this trait was selected in the tetraploid backcrossed lines.

After backcrossing, 37 out of 87 BC₁F₂s had better harvest index out of which 12 had better drought tolerance index than the recurrent parent, BR1 (S1 Appendix). After three rounds of selection based on seed size, harvest index and drought tolerance index, 64 BC₁F₄ genotypes were planted in green house. They were submitted to 15 days of water stress and evaluated for physiological responses associated to drought tolerance and agronomical traits. During dry period, twelve genotypes, including LViPE-06, showed evident drought sensitivity (42 P5, 51 P3, 53 P9, 62 P3, 62 P5, 70 P1, 70 P9, 78 P4, 82 P9, 89 P8, and 96 P3), such as drastic loss of turgor and reduced growth, even after reestablishment of watering. The other remaining genotypes showed moderate behavior with only slight reduction of growth and leaf turgor.

All 64 genotypes were evaluated using seven drought-tolerance related physiological traits. The data were used to clustering analysis, based on UPGMA method. Five groups were found, among them the Group 2 was the most interesting because 26 genotypes clustered

close to BR1 and Senegal 55-437 (Fig 2). Overall, these genotypes maintained high stomatal conductance (g_s) (Fig 3A), resulting in increased transpiration rate (E , Fig 3B). This combination favored the maintenance of net photosynthetic rate (P_N , Fig 3C), reducing the intercellular CO_2 concentration (C_i , Fig 3D) in these plants, during the period of water restriction.

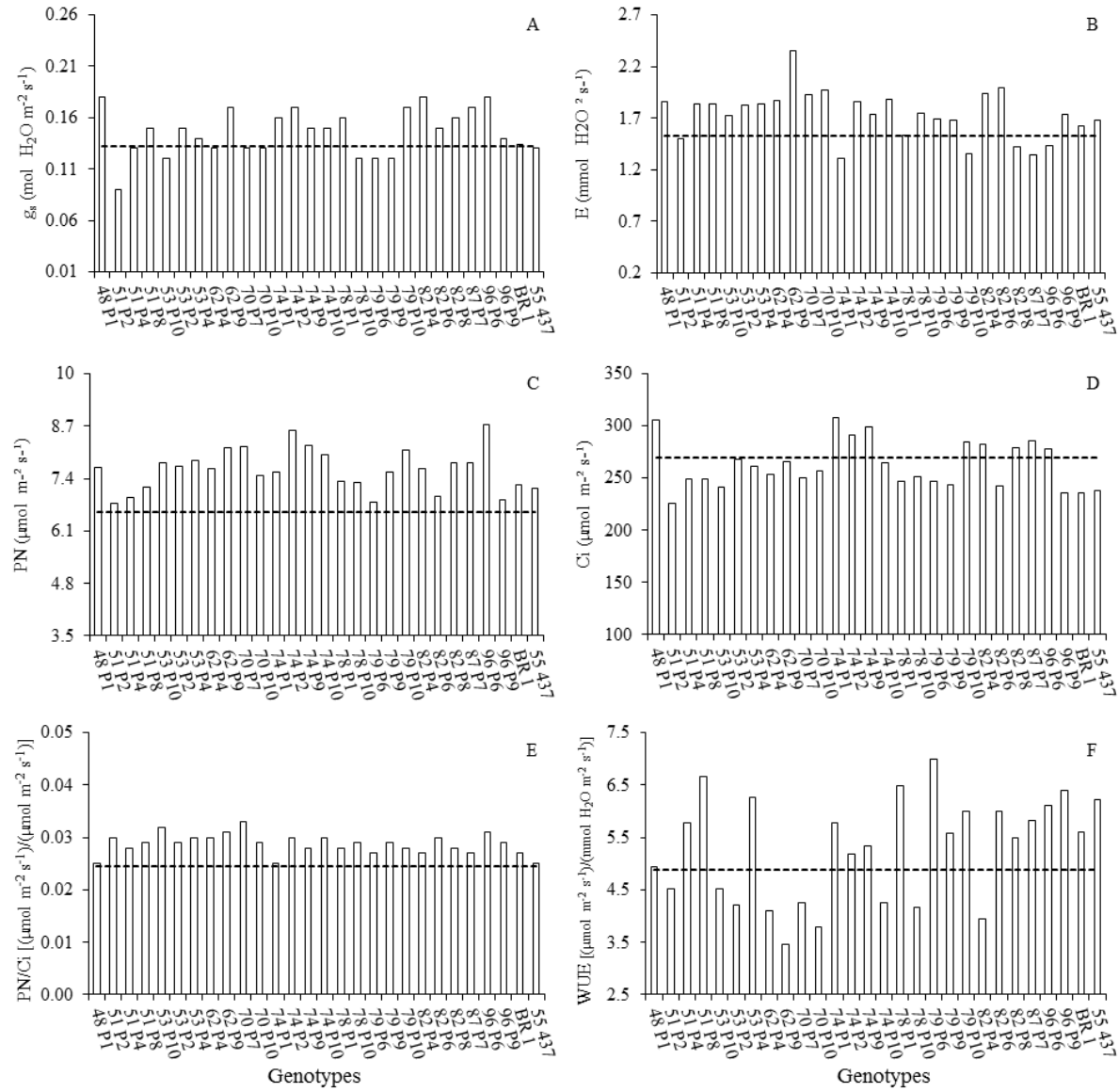


Figure 3. Gas exchange of peanut line clustered in G2 group. A- Stomatal conductance (g_s), B- transpiration rate (E), C- net photosynthetic rate (P_N), D- intercellular CO_2 concentration (C_i), E- instantaneous carboxylation efficiency (P_N/C_i), F- instantaneous water use efficiency (WUE). Dashed line is the estimated mean of 64 lines. BR1 and 55-437 (Controls).

As seen in Fig. 3E, most genotypes showed instantaneous carboxylation efficiency (P_N/C_i) similar or higher than BR1. This indicates efficiency in CO₂ fixation in low water availability. Eleven genotypes had superior water use efficiency than the control recurrent parent BR1 (Fig 3F). Additionally, eight out of 64 BC₁F₄ plants produced heavier pods and three produced heavier seeds (S1 Appendix). This indicates that these genotypes were more tolerant to water stress, based on the experimental conditions adopted here.

Plants often regulate stomata closure under water deficit, reducing transpiration in order to overcome the stress period. This situation leads to reduction of CO₂ influx. According to the literature, stomatal conductance (g_s) is one of the main factors limiting photosynthesis in plants under water stress [2, 4]. As expected, stomatal conductance was positively correlated with net photosynthetic rate (Table 1). In semiarid environments, the occurrence of intermittent drought (also called *Indian summer* or *veranico*) during the rainy season is frequent and is usually associated with high solar radiation. This combination may lead to severe damage to the photosynthetic apparatus, and therefore, reduces substantially the CO₂ fixation in plants. In order to avoid this damage, plants develop several protective mechanisms, such as non-photochemical quenching (NPQ), that is responsible for light energy balance with the photosynthesis [4]. In this study, the value of NPQ of 15 genotypes exceeded the general mean (Fig 4), among them, 10 were similar or higher than BR1, indicating that these genotypes were able to eliminate the excess energy, improving the functioning of the photosynthetic apparatus even under water stress. According to Kalariya et al. [4], that submitted several peanut genotypes to water restriction, intercellular CO₂ concentration (C_i), net photosynthetic rate (P_N) and non-photochemical quenching (NPQ) are traits that provide wide variation in plants under water stress.

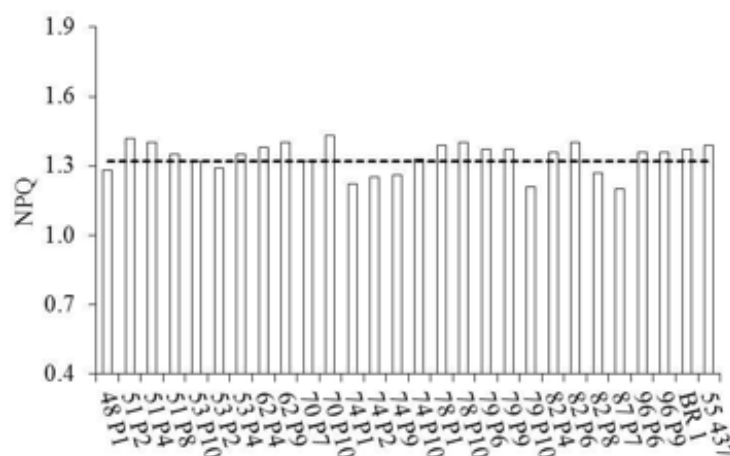


Figure 4. Non-photochemical quenching (NPQ) of peanut line clustered in G2 group. Dashed line is the estimated mean of 64 lines. BR1 and 55-437 (Controls).

The correlation of these traits is found in Table 1. Highly significant correlations were found to g_s x P_N (0.57), g_s x NPQ (-0.52), g_s x C_i (0.76), P_N x C_i (0.62) and NPQ x C_i (-0.75), indicating that these can be used as surrogate traits for selection procedures in breeding programs for drought tolerance in peanut.

Table 1: Pearson correlation between physiological traits: stomatal conductance (g_s), net photosynthetic rate (P_N), instantaneous carboxylation efficiency (P_N/C_i), instantaneous water use efficiency (WUE), non-photochemical quenching (NPQ), transpiration rate (E), and intercellular CO_2 concentration (C_i) of peanut lines.

Traits	P_N	P_N/C_i	WUE	NPQ	E	C_i
g_s	0.57**	0.10 ^{ns}	-0.38*	-0.52**	0.56**	0.76**
P_N	-	0.61**	0.26 ^{ns}	-0.50**	0.42*	0.62**
P_N/C_i	-	-	-0.32 ^{ns}	0.42*	0.39*	-0.47*
WUE	-	-	-	-0.18	-0.51**	-0.05 ^{ns}
NPQ	-	-	-	-	0.49**	-0.75**
E						-0.19 ^{ns}

^{ns} not significant, * and ** significant to $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively.

The BC₁F₄ lines evaluated, at the end of the cycle, presented pods with varied size and seed number, and seeds of smaller size than the recurrent parent, BR1 (Fig 5).

In order to identify the most promising lines in G2-group for further evaluation in field assay, a 30%-selection was applied, based on previous data of anthesis of 22-23 days after emergence, weight of pods/plant: ≥ 20 g, and number of pods/plant: ≥ 15 . With these criteria, eight genotypes were selected for field evaluation.



Figure 5. Phenotypical variants seen in pods and seeds of BC1F4 lines and BR1. A, D and E- Lines 53 P6, 48 P8 and 87 P2 showing small and constricted pods, and small and lighter seeds; B and C- Pods and seeds of BR1.

4.3.4. Validation of drought tolerant progenies through field assays

The selected eight lines were tested for drought tolerance in two different environments, Lagoa Seca, PB and Campina Grande, PB, during the rainy period 2016 and 2017, respectively. The precipitation during the cycle was 95 mm and 277 mm, respectively. In Lagoa Seca, three periods of *Indian summer* lasted for nine to 16 days, at the critical times of blooming, beginning of pod formation and seed formation (Fig 6A). The low rainfall associated with high evaporation strongly influenced the production of lines. In Campina Grande, two 10-day periods of *Indian summer* were recorded at beginning of growth and at final of pod maturation (Fig 6B).

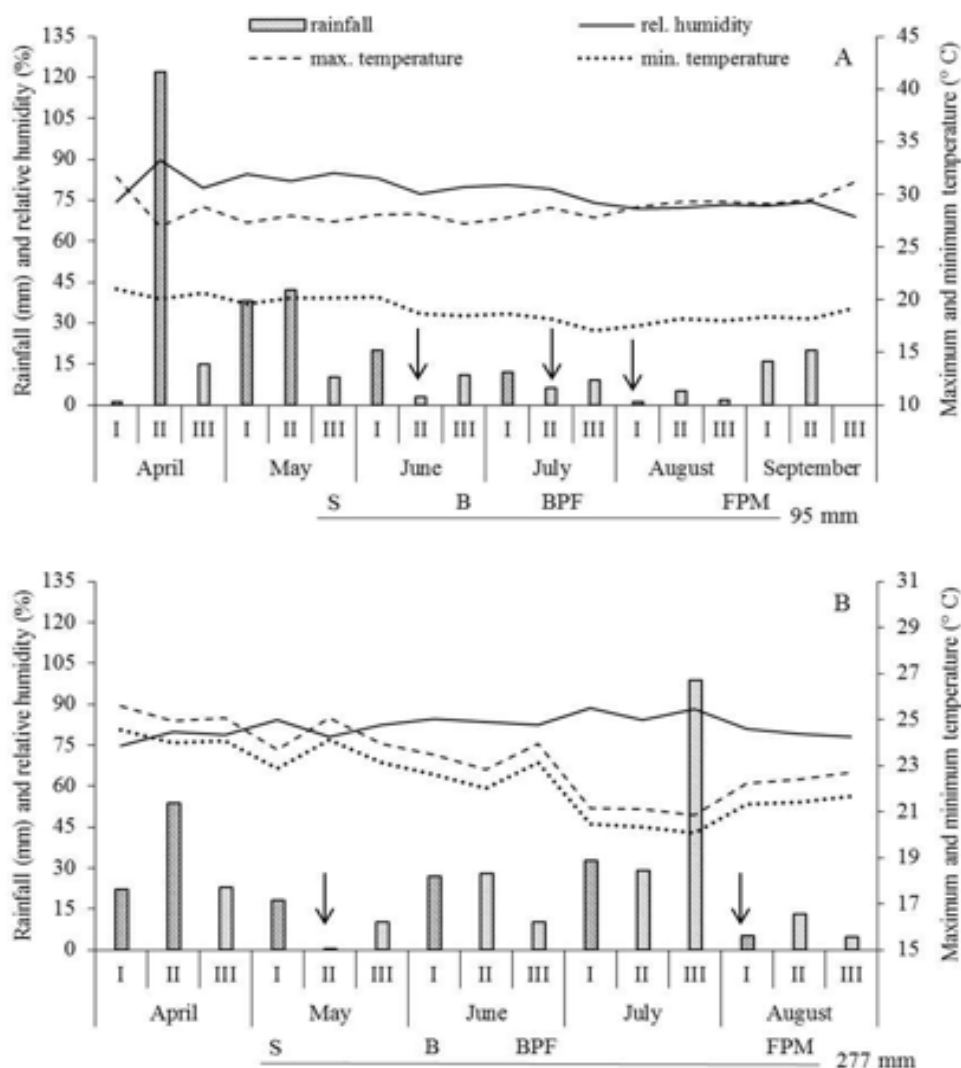


Figure 6. Climate data registered during assays in Lagoa Seca (A) and Campina Grande (B), PB, Brazil. S- sowing, B- blooming, BPF- beginning of pod formation, FPM- full pod maturation. Arrows mean periods of Indian summer.

Yield-related traits were measured in these two environments. The drought tolerant control and recurrent parent, BR1 showed high yield stability, with similar values in both environments (Table 2). Segregating lines, however, were widely influenced by environments (E), especially for number of pods per plant (NP/P) and yield (Table 2), both quantitatively inherited and dependent of crop management [34]. In Lagoa Seca (low rainfall), two lines, 53 P4 and 96 P9, had similar yield to BR1. In Campina Grande, in better conditions, these same lines plus 51P4 and 82P6 yielded more than BR1. This shows that under mild drought stress, wild introgressions, provided increased yield and under quite severe stress, yield is maintained at the same level as the recurrent parent.

Table 2: Summary of combined- variance analyses of anthesis (A), number of pods/plant (NP/P), number of seeds/pod (NS/P) and yield of introgression lines grown in Lagoa Seca (LS) and Campina Grande (CG), Paraíba, Brazil, during rainy season.

SV	DF	MS						
		A (dae)	NP/P	NS/P	Yield (kg ha ⁻¹)			
Bl/E	4	1.778	3.881	0.022	9889.575			
E	1	13.500 ^{ns}	976.225 ^{**}	1.176 ^{**}	17794344.498 ^{**}			
G	8	1.583 ^{ns}	39.824 ^{ns}	0.168 ^{ns}	529735.225 ^{ns}			
G x E	8	0.500 ^{ns}	25.873 ^{**}	0.141 ^{**}	322708.331 ^{**}			
Error	16	0.507	2.701	0.073	14856.925			
Mean		23.50	19.52	2.96	1608.29			
CV (%)	32	3.03	8.42	2.87	7.58			
Means of traits in environments								
Genotypes	A (dae)		NP/P		NS/P		Yield (kg ha ⁻¹)	
	LS	CG	LS	CG	LS	CG	LS	CG
51 P4	22.7	23.3	15.6abB	25.7aA	2.6cB	3.2aA	1149.8bB	2265.9abA
51 P8	23.0	24.0	14.3bcB	20.4bA	2.3dB	3.1aA	722.8cdB	2010.7cdeA
53 P4	23.3	23.7	17.7abB	28.3aA	3.0ab	3.1aA	1722.3aB	2487.5abA
78 P1	23.7	23.7	12.6cB	19.6bA	2.9bB	3.1aA	1044.3bcdB	1752.4eA
79 P6	23.0	24.7	15.9abB	27.5aA	2.9bB	3.1aA	1073.8bcB	1926.1deA
79 P9	23.3	24.7	13.3bcB	19.9bA	2.4dB	3.1aA	671.4dB	2173.6bcdA
82 P6	22.7	24.0	14.1bcB	26.8aA	3.0ab	3.0aA	878.9bcdB	2265.9bcA
96 P9	22.0	23.0	15.9abB	28.1aA	3.2aA	3.2aA	1807.8aB	2700.1aA
BR1	23.3	25.0	17.9aB	17.7bA	3.2aA	3.2aA	1841.0aA	1857.9deA

dae = days after emergence, SV- source of variance, DF- degree of freedom, MS- mean square, Bl- block, E- environment, G- genotype, CV- coefficient of variation, kg ha⁻¹ - kilograms per hectare, ^{ns}- not significant, ^{**}- Significant, F test ($p \leq 0.01$). Means with same letters do not differ statically. Letters in upper case represent comparisons between environment and lower case, among genotypes, by Tukey test ($p \leq 0.05$).

As to other traits, no G x E effect was found on number of days to anthesis (A). These results were expected since the selection of all eight lines in group G2 (Fig 2) were previously based on earliness and pod pattern of BR1.

The results obtained here are very significant because they reveal the genetic adaptation of the introgression lines. The genus *Arachis* is divided in nine sections and most of species are diploid with negligible fertility when crossed directly with *A. hypogaea* [6]. The genetic resources in the genus *Arachis* are extremely diverse, representing a valuable source of genes to environmental adaptation and tolerance to abiotic and biotic stresses [35]. In the literature, a few papers have reported the identification of diploid species with broad tolerance to water stress [1, 36, 37]. The inheritance of genes associated to drought is quite complex, and wild species harbor many agronomically unadapted traits. Therefore, backcrossing is

necessary [1]. In an early generation of induced allotetraploid used in this work [BR1 x (BatDur)], the progenies showed phenotypic traits more similar to the wild species, especially traits associated to pods. However, a single cycle of backcrossing with BR1, together with selection, was enough to restore pod traits to a commercial standard.

The two peanut lines found here, 53 P4 and 96 P9, are promising materials for drought tolerance-improvement because they were better than BR1 and some physiological traits of tolerance to drought were probably inherited from the wild species. The phenotypical profile of both lines are shown in Fig 7. The external aspects of these plants (height, canopy and pod conformation) were similar to BR1, indicating that in spite of the introgression of wild genes, the architecture of donor cultivar was recovered.



Figure 7. Detail of BC1F6 advanced lines grown in field. A- Plant canopy, B- Pod production, C- seed pattern of 53 P4 (1), 96 P9 (2), and *A. hypogaea* BR1 (3).

4.4. Conclusions

The BR1 is a peanut cultivar widely grown in semiarid environment. It was commercially released in mid 90's, and up to now, has broad acceptance by Northeastern farmers [20, 34]. The current Brazilian peanut cultivars were generated from *A. hypogaea* accessions, which has narrow genetic basis. The adoption of these new breeding lines represents an opportunity to broaden the genetic base of future cultivars, as well as to open the opportunity for the use of wild genetic resources in breeding programs, which are often maintained only in germplasm collections. The lines created here are very promising materials for advancement in peanut breeding for the semiarid environment.

The results presented here represent a great contribution to the peanut breeding developed to semiarid environment, especially since it deals with the valorization of wild species genes introduced for *A. hypogaea*. Several germplasm banks in the world have thousands of accesses of species kept in order to maintain the integrity of the genetic heritage. The use, however, of such accesses for genetic improvement has been limited, due to methodological difficulties or chromosome barriers. In the present work, it is possible to recover the phenotypic pattern of BR 1, which is an earliness and high yield Valencia type. With the two lines found here, it is possible to advance the breeding works, with perspective of develop new cultivars, keeping the baggage of BR 1 and the inherited traits of the wild species. In addition, this work opens opportunities of new studies, involving the knowledge and interaction of new introgression genes in peanuts, especially for drought tolerance.

4.5. Conflict of interests

The authors declare no conflict of interest in the conduction of this study.

4.6. Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Embrapa Genetic Resources and Biotechnology for concession of induced allotetraploid germplasm, and to CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel) for grants.

4.7. S1 Appendix

Data of four generations of lines derived from the induced allotetraploid (*A. batizocoi* x *A. duranensis*)^{4x} crossed and backcrossed with *A. hypogaea* subsp *fastigiata* cv BR1).

This file provides data of four generations of lines derived from the induced allotetraploid [(*A. batizocoi* x *A. duranensis*)^{4x} crossed and backcrossed with *A. hypogaea* subsp *fastigiata* cv BR1].

Generation	Conditions	Location	Traits evaluated
1- BC ₁ F ₂	Assay carried out in green house	Universidade Federal Rural do Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brazil	Harvest index (HI) and Drought tolerance index (DTI)
2- BC ₁ F ₃	Assay carried out in the field	Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, Brazil	Harvest index (HI)
3- BC ₁ F ₄	Assay carried out in green house	Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, Brazil	100 pod weight and 100 seed weight
4- BC ₁ F ₆	Assay carried out in the field	Campina Grande and Lagoa Seca, PB, Brazil	100 seed weight

4.7. S1 Appendix: Continuation...

Harvest index (HI) and drought tolerance index (DTI) of BC ₁ F ₂ lines submitted to 15 days of water suppression - Greenhouse								
Genotype	HI	DTI	Genotype	HI	DTI	Genotype	HI	DTI
1	32.32	0.49	66	34.02	0.4	136	32.06	0.54
2	22.77	0.49	67	40.76	0.52	139	39.6	0.47
3	45.11	0.65	68	39.19	0.55	140	39.56	0.59
5	43.41	0.69	70	41.13	0.71	145	23.75	0.54
8	22.56	0.49	74	41.62	0.72	146	26.64	0.65
10	37.28	0.57	77	42.5	0.46	148	27.57	0.57
13	43.29	0.61	78	45.04	0.72	150	39.86	0.56
16	24.86	0.45	79	45.33	0.72	154	30.46	0.57
19	27.91	0.43	82	46.48	0.71	155	22.52	0.59
20	30.83	0.5	83	31.69	0.63	156	28.81	0.64
21	43.08	0.56	85	41.78	0.47	157	31.62	0.53
25	39.39	0.57	87	43.48	0.71	159	30.17	0.52
26	37.06	0.58	89	40.73	0.72	160	22.73	0.54
31	28.04	0.51	94	29.02	0.65	161	40.78	0.49
36	22.9	0.53	95	37.34	0.53	166	25.35	0.62
42	44.07	0.71	96	40.92	0.71	168	25.03	0.59
43	30.74	0.52	101	23.22	0.28	169	26.00	0.57
44	46.11	0.64	102	39.73	0.54	170	30.92	0.55
47	36.7	0.57	108	36.00	0.48	172	35.19	0.58
48	37.17	0.72	110	22.88	0.66	180	29.73	0.54
51	42.77	0.72	114	32.66	0.41	182	31.18	0.32
53	42.87	0.71	117	45.58	0.51	185	30.03	0.55
54	27.54	0.49	118	37.15	0.55	187	30.17	0.60
55	42.36	0.57	121	24.64	0.51	188	37.22	0.64
57	43.76	0.44	123	31.81	0.66	189	35.88	0.57
58	44.7	0.6	124	33.89	0.51	198	25.8	0.50
60	24.01	0.45	127	23.61	0.52	201	27.83	0.55
61	44.21	0.55	129	30.28	0.55	BR 1	35.5	0.66
62	43.64	0.59	133	30.09	0.53			
64	29.58	0.44	134	25.44	0.43			

Data in bold = values equal or the same as the recurrent parent BR1 (control).

4.7. S1 Appendix: Continuation...

Harvest index (HI) of BC₁F₃ lines in the field (Campina Grande, PB)					
Genotype	HI	Genotype	HI	Genotype	HI
42 P1	26.31	62 P10	31.53	82 P4	31.98
42 P3	33	70 P1	30.56	82 P6	33.3
42 P5	32.77	70 P6	31.69	82 P7	25.5
42 P6	25.18	70 P7	32.77	82 P8	30.87
42 P8	30.63	70 P9	30.83	82 P9	32.36
48 P1	32.54	70 P10	31.01	82 P10	25.17
48 P4	25.28	74 P1	30.87	87 P1	25.6
48 P6	26.92	74 P2	33.1	87 P2	32.66
48 P7	32.25	74 P4	32.88	87 P4	31.55
48 P8	31.61	74 P5	25.86	87 P5	31.86
51 P2	32.98	74 P6	32.63	87 P6	26.45
51 P3	31.34	74 P9	33.24	87 P7	33.53
51 P4	30.77	74 P10	31.06	87 P9	31.27
51 P7	31.93	78 P1	32.89	87 P10	32.38
51 P8	32.81	78 P4	33.25	89 P1	30.93
53 P2	30.94	78 P6	25	89 P3	31.1
53 P3	31.84	78 P7	31.67	89 P4	31.89
53 P4	32.82	78 P10	33.27	89 P5	25.62
53 P6	31.64	79 P1	33.19	89 P7	25.91
53 P9	32.69	79 P2	32.77	89 P8	25.83
53 P10	31.25	79 P3	33.23	96 P3	26.45
62 P3	30.02	79 P6	32.22	96 P6	32.58
62 P4	32.55	79 P9	32.46	96 P7	26.25
62 P5	33.01	79 P10	31.41	96 P8	32.1
62 P8	32.09	82 P1	30.03	96 P9	32.49
62 P9	32.21	82 P3	31.62	BR 1 (control)	33.65

4.7. S1 Appendix: Continuation...

100 pod weights (100PW) and 100 seed weight (100SW) of BC₁F₄ lines submitted to 15 days of water suppression. Greenhouse (Campina Grande. PB).

Genotype	100PW	100SW	Genotype	100PW	100SW	Genotype	100PW	100SW
42 P3	120.11	41.1	62 P9	117.8	43.2	82 P1	37.2	18.2
42 P5	76.5	30.4	70 P1	80.37	32.9	82 P3	122.5	33.2
42 P8	51.86	23.9	70 P6	77.45	29.4	82 P4	79.91	33.9
48 P1	101.14	37.3	70 P7	73.5	41.7	82 P6	108.31	43.5
48 P7	125.29	42.00	70 P9	88.42	30.7	82 P8	65.66	25.00
48 P8	76.28	36.00	70 P10	85.61	43.1	82 P9	64.75	26.6
51 P2	69.71	28.2	74 P1	60.85	36.4	87 P2	88.00	32.7
51 P3	56.17	27.5	74 P2	135.72	36.4	87 P4	109.00	40.4
51 P4	90.00	37.2	74 P4	66.15	26.5	87 P5	89.57	43.9
51 P7	89.88	38.7	74 P6	107.88	32.5	87 P7	92.33	44.00
51 P8	92.52	45.00	74 P9	61.92	24.00	87 P9	53.00	21.2
53 P2	106.00	36.2	74 P10	101.82	46.8	87 P10	92.22	34.6
53 P3	47.85	18.3	78 P1	107.71	41.6	89 P1	41.09	15.3
53 P4	103.4	43.1	78 P4	79.9	32.00	89 P3	65.27	46.3
53 P6	84.14	39.9	78 P7	91.88	45.2	89 P4	46.46	24.1
53 P9	69.25	38.6	78 P10	126.8	27.7	89 P8	81.6	42.9
53 P10	86.8	45.7	79 P1	68.73	41.7	96 P3	46.12	16.00
62 P10	74.00	46.00	79 P2	77.72	41.4	96 P6	104.37	42.8
62 P3	76.57	29.9	79 P3	76.41	24.6	96 P8	94.46	37.7
62 P4	114.87	38.6	79 P6	97.00	47.4	96 P9	100.73	44.7
62 P5	56.4	29.3	79 P9	92.66	40.2	BR 1	108.5	44.2
62 P8	95.06	42.1	79 P10	114.41	43.9			

Data in bold = values equal or the same as the recurrent parent BR1 (Control).

4.7. S1 Appendix: Continuation...

100 seed weight (g) of BC₁F₆ lines in the field in Lagoa Seca (LS) and Campina Grande (CG), PB.

Genotypes	LS	CG
51 P4	41.87	42.75
51 P8	41.59	42.81
53 P4	42.26	43.15
78 P1	41.94	43.37
79 P6	42.41	43.62
79 P9	41.12	42.91
82 P6	42.25	43.99
96 P9	42.01	43.46
BR 1	42.94	44.30

BC₁F₆ all very similar.

4.8. References

1. Leal-Bertioli SCM, Bertioli DJ, Guimarães PM, Pereira TD, Galhardo I, Silva JP, Brasileiro ACM, Oliveira RS, Silva PIT, Vadez V, Araujo ACG. The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits. *Environ Exp Bot.* 2012; 84: 17-24. doi: 10.1016/j.envexpbot.2012.04.005
2. Lisar SYS, Motafakkerazad R, Hossain MM, Rahman IMM. Water stress in plants: causes, effects and responses. In: Rahman IMM, editor. *Water Stress*, Rijeka: INTECH; 2012. pp. 1-14.
3. Pereira JWL, Albuquerque MB, Melo Filho PA, Nogueira RJMC, Lima LM, Santos RC. Assessment of drought tolerance of peanut cultivars based on physiological and yield traits in a semiarid environment. *Agric Water Manag.* 2016; 166 : 70-76. doi: 10.1016 / j.agwat.2015.12.010.
4. Kalariya KA, Singh AL, Goswami N, Mehta D, Mahatma MK, Jay BC, Chakraborty K, Zala PV, Chaudhary V, Patel CB. Photosynthetic characteristics of peanut genotypes under excess and deficit irrigation during summer. *Physiol Mol Biol Plants.* 2015; 21: 317-327. doi: 10.1007/s12298-015-0300-8.
5. Clavel D, Diouf O, Khalfaoui JL, Braconnier S. Genotypes variations in fluorescence parameters among closely related groundnut (*Arachis hypogaea* L.) lines and their potential for drought screening programs. *Field Crops Res.* 2006; 96: 296-306. doi: 10.1016/j.fcr.2005.07.012.

6. Krapovickas A, Gregory WC. Taxonomy of the genus *Arachis* (Leguminosae). Bonplandia. 2007: 16 (Supl.): 1-205.
7. Valls JFM. Recursos genéticos do gênero *Arachis*. In: Santos RC, Freire RMM, Lima LM, editors. O agronegócio do amendoim no Brasil, Campina Grande: Embrapa Algodão; 2013. pp. 45-69.
8. Simpson CE, Nelson SC, Starr JL, Woodard KE, Smith OD. Registration of TxAG-6 and TxAG-7 peanut germplasm lines. Crop Sci. 1993: 33: 1418.
9. Dwivedi SL, Upadhyaya HD, Stalker HT, Blair MW, Bertoli DJ, Nielen S, Ortiz R. Enhancing crop gene pools of cereals and legumes with beneficial traits using wild relatives. Plant Breed Rev. 2008: 30: 179-280.
10. Mallikarjuna N, Senthilvel S, Hoisington D. Development of synthetic groundnuts (*Arachis hypogaea* L.) to broaden the genetic base of cultivated groundnut. Genet Resour Crop Evol. 2011: 58: 889-907. doi: 10.1007 / s10722-010-9627-8.
11. Leal-Bertoli SCM, Santos SP, Dantas KM, Inglis PW, Nielen S, Araújo ACG, Silva JP, Cavalcante U, Guimarães PM, Brasileiro ACM, Carrasquilla-Garcia N, Penmetsa RV, Cook D, Moretzsohn MC, Bertoli DJ. *Arachis batizocoi*: a study of its relationship to cultivated peanut (*A. hypogaea*) and its potential for introgression of wild genes into the peanut crop using induced allotetraploids. Ann Bot. 2015: 115: 237-249. doi: 10.1093 / aob / mcu237.
12. Fonceka D, Hodo-Abalo T, Rivallan R, Faye I, Sall MN, Ndoeye O, Favero AP, Bertoli DJ, Glaszmann JC, Courtois B, Rami JF. Genetic mapping of wild introgressions into cultivated peanut: a way toward enlarging the genetic basis of a recent allotetraploid. BMC Plant Biol. 2009. 9: 103.
13. Simpson CE, Smith OD. Registration of Tamnut 74 peanut. Crop Sci. 1975: 15: 603-604.
14. Simpson CE, Starr JL. Registration of 'Coan' peanut. Crop Sci. 2001: 41: 918-920. doi: 10.2135 / crops2001.413918x.
15. Simpson CE, Starr JL, Church GT, Burrow MD, Paterson HA. Registration of NemaTAM peanut. Crop Sci. 2003: 43: 1561. Doi: 10.2135/crops2003.1561.
16. Holbrook CC, Timper P, Culbreath AK, Kvien CK. Registration of 'Tifguard' peanut. J Plant Regist. 2008: 2: 92-94. doi:10.3198/jpr2007.12.0662crc.
17. Isleib TG, Milla-Lewis SR, Pattee HE, Copeland SC, Zuleta MC, Shew BB, Hollowell JE, Sanders TH, Dean LO, Hendrix KW, Balota M, Chapin JW. 2011. Registration of Bailey peanut. J. Plant Registrations 5:27-39.

18. Fávero AP, Simpson CE, Valls JFM, Vello NA. Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipäensis*, *A. duranensis*, and *A. hypogaea*. Crop Sci. 2006; 46: 1546-1552.
19. Leal-Bertioli SCM, Moretzsohn MC, Santos SP, Brasileiro ACM, Guimarães PM, Bertioli DJ, Araújo ACG. Phenotypic effects of allotetraploidization of wild *Arachis* and their implications for peanut domestication. Am J Bot. 2017; 104: 379-388. doi: 10.3732 / ajb.1600402.
20. Faye I., Hodo-Abalo T., Ndoeye O. and Fonceka D., 2016. Dossier technique d'homologation de nouvelles variétés d'arachide. ISRA. 34 pages.
21. Gomes LR, Santos RC, Anunciação Filho CJ, Melo Filho PA. Adaptabilidade e estabilidade fenotípica em genótipos de amendoim de porte ereto. Pesq Agropec Bras. 2007; 72: 985-989.
22. Pereira JWL, Silva ECA, Luz LN, Nogueira RJMC, Melo Filho PA, Lima LM, Santos RC. Cluster analysis to select peanut drought tolerance lines. Aust J Crop Sci. 2015; 11: 1095-1105.
23. Painawadee M, Jogloy S, Kesmala T, Akkasaeng C, Patanothai A. Identification of traits related to drought resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Asian J Plant Sci. 2009; 8: 120-128. doi: 10.3923/1jps.2009.120.128.
24. Nautiyal PC, Nageswara-Rao RC, Joshi YC. Moisture deficit induced change in leaf water content, leaf carbon exchange rate and biomass production in groundnut cultivars differing in specific leaf area. Field Crops Res. 2002; 74: 67-79. doi: 10.1016/S0378-4290(01)00199-X.
25. Assunção HF, Escobedo JF. Estimativa da exigência hídrica do amendoim usando um modelo agrometeorológico. Irriga. 2009; 14: 325-335.
26. Santos RC, Rego GM, Santos CAF, Melo Filho PA, Silva APG, Gondim TMS, Suassuna TF. Recomendações técnicas para o cultivo do amendoim em pequenas propriedades agrícolas do Nordeste brasileiro (Embrapa Algodão. Circular técnica, 102). Campina Grande: Embrapa Algodão; 2006.
27. Doorenbos J, Kassam, AH. Yield response to water (FAO Irrigation and Drainage, Paper 33). Rome: FAO, 1979.
28. Silva FG, Dutra WF, Dutra AF, Oliveira IM, Filgueiras LMB, Melo AS. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em plantas de berinjela sob lâminas de irrigação. Rev Bras Eng Agríc Ambient. 2015; 19: 946-952. doi: 10.1590/1807-1929/agriambi.v19n10p946-952.

29. Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynth Res.* 2004; 79: 209-218. doi: 10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d.
30. Cruz CD. Genes: A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Sci Agron.* 2013; 35: 271-276. doi: 10.4025/actasciagron.v35i3.21251.
31. Sneath PH, Sokal RR. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman; 1973.
32. Goodman MM. Distance analysis in biology. *Syst Zool.* 1972; 21: 174-186. doi: 10.2307/2412287.
33. Brasileiro ACM, Morgante CV, Araujo ACG, Leal-Bertioli SCM, Silva AK, Martins ACQ, Vinson CV, Santos CMR, Bonfim O, Togawa RC, Saraiva MAP, Bertioli DJ, Guimarães PM. Transcriptome profiling of wild arachis from water-limited environments uncovers drought tolerance candidate genes. *Plant Mol Biol Rep.* 2015; 33: 1876-1892. doi: 10.1007/s11105-015-0882-x.
34. Santos RC, Rêgo MG, Silva APG, Vasconcelos JOL, Coutinho JLB, Melo Filho PA. Produtividade de linhagens avançadas de amendoim em condições de sequeiro no Nordeste brasileiro. *Rev Bras Eng Agríc Ambient.* 2010; 14: 589–593.
35. Bertioli DJ, Seijo G, Freitas FO, Valls JFM, Leal-Bertioli SCM, Moretzsohn MC. An overview of peanut and its wild relatives. *Plant Genet Resour.* 2011; 9: 134-149. doi: 10.1017 / S1479262110000444.
36. Nautiyal PC, Rajgopal K, Zala PV, Pujari DS, Basu M, Dhadhal BA, Nandre BM. Evaluation of wild *Arachis* species for abiotic stress tolerance: I. Thermal stress and leaf water relations. *Euphytica.* 2008; 159: 43-57. doi: 10.1007/s10681-007-9455-x.
37. Azevedo Neto AD, Nogueira RJMC, Melo Filho PA, Santos RC. Physiological and biochemical responses of peanut genotypes to water deficit. *J Plant Interact.* 2010; 5: 1-10. doi: 10.1080/17429140902999243.

CAPÍTULO II

ATIVIDADE ANTIOXIDATIVA E PROLINA LIVRE EM ALOTETRAPLOIDES DE AMENDOIM SUBMETIDOS À SUSPENSÃO DA IRRIGAÇÃO

Artigo a ser submetido à revista *Physiology and Molecular Biology of Plants*.

5. ATIVIDADE ANTIOXIDATIVA E PROLINA LIVRE EM ALOTETRAPLOIDES DE AMENDOIM SUBMETIDOS À SUSPENSÃO DA IRRIGAÇÃO

Wellison F. Dutra¹; Jean P. C. Ramos¹; Carliane R. C. da Silva²; David J. Bertioli³; Soraya C. de M. Leal-Bertioli⁴; Roseane C. dos Santos²

¹Programa e Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba, Rodovia PB 079, km 12, CEP 58397-000, Areia-PB, Brasil.

²Laboratório de Biotecnologia, Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, nº 1143, Centenário, CEP 58428-095, Campina Grande-PB, Brasil.

³Crop and Soil Science Department/Center for Applied Genetic Technologies, University of Georgia, 111, Riverbend Rd, Athens, GA 30602.

⁴Plant Pathology Department/Center for Applied Genetic Technologies, University of Georgia, 111, Riverbend Rd, Athens, GA 30602.

Resumo - A seca é um fator limitante para a produtividade agrícola em regiões semiáridas, como em parte do Nordeste do Brasil, onde o cultivo de espécies importantes depende da disponibilização de cultivares com tolerância à seca. No caso do amendoim, o uso de espécies selvagens é visto como uma importante ferramenta no melhoramento para condições de semiárido. Em condições de seca, alterações associadas à geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio, bem como a produção e acúmulo de osmoprotetores são comumente observadas em plantas. Em termos agronômicos, a eficiência do uso da água é considerada um importante descritor para seleção de genótipos superiores para cultivo em regiões semiáridas. Neste estudo, alotetraploides de amendoim foram avaliados em casa de vegetação e em campo focalizando em características moleculares, bioquímicas e agronômicas, com o intuito de identificar e selecionar plantas com melhor capacidade de se ajustar em condições de estresse hídrico. Houve diferença significativa para a expressão e atividade das SODs entre os materiais eretos e o rasteiro. A atividade das SODs e o conteúdo de prolina foram correlacionados com o nível de expressão dos transcritos correspondentes. Os alotetraploides 53 P4 e 96 P9 se destacaram na produção e uso eficiente da água, sendo materiais promissores para o uso em programas de melhoramento visando à ampliação da base genética e a síntese de novas cultivares com tolerância à seca.

Palavras-chave: oleaginosa, capacidade antioxidativa, produção, seleção, tolerância à seca.

Abstract - Drought is a limiting factor for agricultural productivity in semiarid regions, as in part of the Northeast of Brazil, where the important species cultivation depends on the availability of drought-tolerant cultivars. In the case of peanuts, the use of wild species is seen as an important tool in breeding for semiarid conditions. In drought conditions, alterations associated to the generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species, as well as the osmoprotectants production and accumulation are commonly observed in plants. In agronomic terms, the water use efficiency is considered an important descriptor for the selection of superior genotypes for semiarid regions cultivation. In this study, peanut allotetraploids were evaluated in greenhouse and in the field focusing on molecular, biochemical and agronomic characteristics, in order to identify and select plants with better capacity to adjust in water stress conditions. There was significant difference for the SODs expression and activity among the erect and the runner materials. The SODs activity and proline content were correlated with the transcripts expression level-corresponding. The 53 P4 and 96 P9 allotetraploids were outstanding in the production and water efficient use, being promising materials for use in breeding programs aimed at the expansion of the genetic base and new cultivars synthesis with tolerance to drought.

Keywords: oilseed, antioxidative capacity, production, selection, drought tolerance.

Abreviações: APX- Ascorbato peroxidase, ASC- Ácido ascórbico, CAT- Catalase, cDNA-DNA complementar; CDG – coeficiente de determinação genotípico; CVg/CVe – coeficiente de variação relativa; dae- dias após a emergência; EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético, GPX- Guaiacol peroxidase, H₂O- Água, H₂O₂- Peróxido de hidrogênio, KCN- Cianeto de potássio, Met- Metionina, NBT- Azul de nitrotetrazólio, O₂- Oxigênio, O₂^{•-}- Radical superóxido, OH[•]- Radical hidroxila, PCR- reação em cadeia da polimerase, PVP- Polivinilpirrolidona, P5CS- Δ¹-pirrolina-5-carboxilato sintetase, ROS- Espécies reativas de oxigênio, RT-qPCR- Reação de transcriptase reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real, SOD- Superóxido dismutase.

5.1. Introdução

A seca é um dos fatores que mais limitam a produção agrícola em ambientes áridos e semiáridos, em várias partes do mundo. No Nordeste brasileiro, a seca tem forte impacto no desenvolvimento econômico e social da população rural, cuja maioria depende das chuvas para desenvolver as atividades agrícolas. Para essa região, a adoção de cultivares melhoradas representa um incremento expressivo para minimizar os efeitos da seca, uma vez que os materiais indicados para manejo frequentemente detêm tolerância ambiental, resultantes de trabalhos de melhoramento que focalizam na seleção de genótipos tolerantes.

A seleção de plantas direcionadas para o ambiente semiárido leva em consideração a habilidade da planta em se adaptar à situação de déficit hídrico, mantendo a maquinaria em condição razoável para produção. Em nível celular, a baixa disponibilidade hídrica leva ao desequilíbrio entre a formação e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS), desencadeando o estresse oxidativo que se reflete diretamente no fenótipo da planta. Os principais tipos de ROS são: oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), H_2O_2 e o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) (Scandalios, 2005; Gill e Tuteja, 2010).

Para eliminar o excesso dessas espécies reativas, as plantas fazem uso de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de desintoxicação celular, cuja velocidade de resposta representa o diferencial entre a tolerância ou sensibilidade ao estresse imposto (Gill e Tuteja, 2010; Barbosa et al., 2014). No processo enzimático, as principais enzimas envolvidas são superóxido dismutase (SOD), responsável pelo início do processo de neutralização de ROS, cujo papel é dismutar radicais $\text{O}_2^{\cdot-}$ para H_2O_2 e oxigênio (O_2); catalase (CAT), responsável pela conversão do H_2O_2 à água (H_2O) e O_2 ; e as peroxidases, como a ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPX), que reduzem o H_2O_2 à H_2O (Apel e Hirt, 2004).

A SOD pertence à família das metaloenzimas e é considerada a barreira antioxidante mais eficaz presente nos compartimentos subcelulares (Gill e Tuteja, 2010). Em plantas superiores, três tipos são caracterizados e classificados de acordo com os cofatores metálicos, que são: cobre e zinco (*Cu/Zn-SOD*), manganês (*Mn-SOD*) e ferro (*Fe-SOD*) (Barbosa et al., 2014). Quanto à localização, a *Cu/Zn-SOD* é a forma mais abundante em células vegetais, sendo detectada principalmente em cloroplastos, citosol e peroxissomos (Pilon et al., 2011; Huseynova et al., 2014). A *Mn-SOD* está presente nas mitocôndrias e peroxissomos, enquanto a *Fe-SOD* é verificada nos cloroplastos (Pilon et al., 2011).

Além das alterações enzimáticas, há modificações na regulação osmótica que envolve a síntese e acúmulo de compostos orgânicos e inorgânicos, cujo ajustamento contribui com a manutenção da turgescência celular próxima do nível adequado para evitar à desidratação

(DaCosta e Huang, 2006). Este ajuste é realizado por meio de produção e acúmulo de compostos orgânicos de baixo peso molecular, não tóxicos e solúveis, como açúcares, prolina, ácidos orgânicos, além de íons inorgânicos como cálcio (Ca^{2+}), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-), entre outros (Farooq et al., 2009). Entre os compostos orgânicos avaliados em condições de estresse, destaca-se a prolina (Delauney e Verma, 1993; Ashraf e Foolad, 2007; Monteiro et al., 2014), cujo conteúdo celular é regulado pela atividade da *P5CS* (Delauney e Verma 1993; Dobrá et al. 2011). De acordo com Ashraf e Foolad (2007), a capacidade de acumular prolina varia em função do genótipo e dos níveis de tolerância ao estresse ambiental.

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma oleaginosa de alto valor comercial que atende aos mercados mundiais de grãos e óleo. O gênero *Arachis*, família Leguminosae (Fabaceae), é originário da América do Sul e possui 81 espécies descritas, sendo a maioria delas diploides ($2n = 2x = 20$) (Valls et al., 2013). A planta é um alotetraploide ($2n = 4x = 40$), isolada reprodutivamente dos parentes selvagens, devido às barreiras cromossômicas, o que contribui para o estreitamento da base genética das cultivares melhoradas (Leal-Bertioli et al., 2015; Dutra et al., 2018).

Apesar da prática limitada em programas de melhoramento, o uso de espécies selvagens é uma excelente estratégia para valoração dos recursos genéticos e ampliar a base genética de futuras cultivares. Com amendoim, a introgressão de alelos de espécies selvagens têm demonstrado sucesso na fixação de caracteres importantes para a lavoura, como tolerância a nematoides transferida para as cultivares Coan (Simpson e Starr, 2001), NemaTAM (Simpson et al., 2003) e Tifguard (Holbrook et al., 2008), além de resistência parcial a doenças para a cultivar Bailey (Isleib et al., 2011), todas cultivadas nos EUA.

No Brasil, um programa de introgressão, conduzido em parceria com Instituições nacionais e internacionais, tem gerado alotetraploides a partir de acessos de *A. batizocoi*, *A. duranensis*, *A. stenosperma*, *A. ipaensis* e *A. magna*, os quais têm demonstrado tolerância a cercosporioses e a ambiente semiárido (Moretzsohn et al., 2009; Leal-Bertioli et al., 2012; 2015). Dutra et al. (2018) procederam vários ciclos de seleção em uma dessas populações, oriunda do cruzamento entre a cultivar BR 1 e o alotetraploide (*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn 2848)^{4x}, focalizando na adaptação ao ambiente semiárido. Os autores identificaram várias linhagens, com média de produção semelhante ou superior ao material atualmente cultivado em parte do Nordeste brasileiro.

Com o intuito de identificar genótipos com maior habilidade de se ajustar em condições de estresse hídrico, sete linhagens identificadas por Dutra et al. (2018) foram avaliadas, focalizando na atividade de tipos de SOD e no acúmulo prolina, mensurados por meio bioquímico e molecular. Os resultados foram devidamente validados e a seleção dos melhores genótipos foi realizada baseando-se nos resultados obtidos em ensaios de campo, conduzidos na estação das águas.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Recurso genético e condução experimental

Sete linhagens (RC₁F₄), oriundas do retrocruzamento {BR1 x [BR 1 x (*A. batizocoi* K9484 x *A. duranensis* SeSn 2848)^{4x}]} foram cultivadas em casa de vegetação e submetidas a estresse hídrico. O anfidiplóide sintético foi gerado pela equipe de Biotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen, Brasil). A cv. BR 1 (*A. hypogaea* subsp. *fastigiata*, *fastigiata*) é um tipo Valencia-ereto e foi usada como genitor devido à sua capacidade produtiva e precocidade (Gomes et al., 2007; Pereira et al., 2015).

O delineamento experimental adotado foi o de blocos incompletos com 10 repetições para cada controle, sendo a parcela composta por um vaso (30 L), preenchido com solo de textura franco arenosa, contendo uma planta (Dutra et al., 2018). Para fins comparativos, em termos de tolerância ao estresse hídrico, dois controles foram utilizados no ensaio: BR 1, tolerante à seca (Pereira et al., 2015) e LViPE-06 (*A. hypogaea* subsp. *hypogaea*), um tipo Virginia- rasteiro, sensível à seca (Pereira et al., 2016). As plantas foram regadas diariamente, mantendo 100% da capacidade de retenção do solo, determinada pelo método gravimétrico (Pereira et al., 2016). A supressão hídrica foi iniciada na antese das plantas (24-25 dias, para genótipos eretos, e 34-35 dias para o rasteiro), com duração de 15 dias. O volume de água usado nas regas foi baseado na evapotranspiração da cultura (ET_c), estimada por meio de tanque de evaporação instalado na casa de vegetação e pelo coeficiente de cultivo (Doorenbos e Kassam, 1994).

Os registros climáticos foram tomados com auxílio de termohigrômetro, cujas variações máxima e mínima de temperatura no período do ensaio, foram de 35 °C a 44 °C e 18 °C a 22 °C, respectivamente, e a média de umidade relativa do ar ficou em 68%. Ao final da suspensão das regas, coletaram-se folíolos jovens situados no terço médio da planta, os quais foram acondicionados em gelo seco para posteriores análises.

5.2.2. Determinação dos tipos da SOD e de prolina livre

A extração das proteínas totais foi realizada em tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) acrescido de ácido ascórbico (ASC; 0,1 mM), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA; 0,1 mM) e polivinilpirrolidona (PVP; 10%), conforme Dutra et al. (2017). A estimativa da concentração foi feita pelo método de Bradford (1976).

A atividade da SOD foi determinada baseando-se na capacidade de inibição da fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) pela enzima presente no extrato (Giannopolitis e Ries, 1977). O protocolo de determinação seguiu de acordo com Dutra et al. (2017). Alíquotas do extrato foram adicionadas ao mix de reação contendo tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,8), EDTA (0,1 mM), metionina (Met; 13 mM) e NBT (75 μ M). A reação foi iniciada a partir da adição de riboflavina (Rib; 2 μ M) e subsequente iluminação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Waltham), a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir em 50% a fotorredução do NBT, sendo a atividade expressa em $\text{U minuto}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

A determinação dos tipos da SOD foi realizada por meio da adição de cianeto de potássio (KCN) e/ou H_2O_2 à mistura de reação descrita anteriormente, seguindo a metodologia proposta por Yu e Rengel (1999). A *Mn-SOD* foi determinada na presença de KCN (5 mM) e H_2O_2 (5 mM) na mistura de reação; a *Fe-SOD* foi obtida subtraindo-se a atividade da *Mn-SOD* da atividade encontrada com a adição apenas de KCN (5 mM) a mistura de reação; e a *Cu/Zn-SOD* foi calculada pela diferença entre a atividade total da SOD e as atividades da *Mn-SOD* e *Fe-SOD*.

A prolina livre foi determinada pelo método colorimétrico proposto por Bates et al. (1973). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 520 nm. A concentração de prolina foi determinada com base na curva padrão de L-prolina (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 50 mg L^{-1}) e expressa em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de matéria fresca (MF). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.2.3. Análise de expressão dos transcritos

O RNA total dos alotetraploides e dos controles (LViPE-06 e BR 1) foi isolado (PureLink™ Plant RNA Reagent, Invitrogen) e quantificado em fluorômetro (Qubit® 3.0, Invitrogen). O cDNA foi sintetizado (QuantiNova™ Reverse Transcription kit, Quiagen) a partir de 1 μg de RNA total de cada amostra.

Para estimar a expressão dos transcritos foram utilizados oligonucleotídeos específicos para os genes dos tipos de SOD e da *P5CS* (Tabela 1), precursor da prolina, em ensaios quantitativo (RT-qPCR). Um par de oligonucleotídeos do gene *β-actina* foi usado como controle de referência (F-5'TTGCAGACCGTATGA3' e R-5'ATCCTCCGATCCAGA3'). Nas reações de RT-qPCR (GoTaq® Green Master Mix, Promega), foram usados 0,4 µl de cada oligonucleotídeo e 1 µl de cDNA. As reações foram realizadas em triplicata biológica e experimental. Todos os procedimentos foram seguidos de acordo com as recomendações dos fabricantes.

As condições de amplificação foram: 95 °C por 2 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. As melt curves e os Cqs foram gerados automaticamente pelo termociclador Eco™ Real-Time PCR System (Illumina) com base no método de normalização com um gene de referência ($\Delta\Delta Cq$). Os diferentes perfis de expressão foram avaliados utilizando a quantificação relativa (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos usados nas reações de RT-qPCR.

Genes	Acesso	Sequências (5' - 3')	Amplicon (pb)
<i>Cu/Zn-SOD</i>	XM_016096272.1	F- TCAACCCGAATAACCTCACA R- TCATGAACCACGAATGCTCT	172
<i>Mn-SOD</i>	XM_016089609.1	F- ATGCCAGCGAAGTGTATGAAAAAG R- TCTTATATGCCACATTACATCCTTTT	137
<i>Fe-SOD</i>	XM_016081854.1	F-GGTGATTTACTCCCTGCTT R-CATCCTGAACCAAACCTGTG	199
<i>P5CS</i>	XM_016094683.1	F- GTCCTGTAGGAGTTGAGGGTTTG R- TTTAGTGGCAGTTCTTTATGAGTGT	112

5.2.4. Ensaios de validação em campo

Com fins de validar os resultados moleculares e bioquímicos e selecionar os melhores genótipos, ensaios foram conduzidos em campo nos municípios de Lagoa Seca, PB (7°08'15.74"S, 35°50'20.05"W, 602 m, Neossolo franco arenoso) e Campina Grande, PB (7°13'50''S, 35°52'52''W 551 m, Vertissolo franco arenoso) durante a estação das águas em 2016 e 2017, respectivamente. Ambos os municípios estão situados na região semiárida do Nordeste brasileiro.

O solo de ambos os locais foi previamente corrigido (2t ha⁻¹ calcário dolomítico) e fertilizado (NPK, 20: 60: 30, sulfato de amônio, superfosfato simples e cloreto de potássio) (Santos et al., 2006). A cultivar BR1 e a linhagem LViPE-06 foram utilizadas como controle

tolerante e sensível ao ambiente semiárido, respectivamente. O plantio foi em fileiras (5 m de comprimento) espaçadas em 70 cm, com densidade de cinco plantas por metro linear. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com três repetições. O manejo da cultura foi realizado conforme as recomendações descritas em Santos et al. (2006).

Ao final do ciclo da cultura (90 dias para os genótipos eretos e 120 dias para o rasteiro) foram determinadas as seguintes variáveis: massa de 100 vagens (g), produção de vagens por parcela (g) e eficiência do uso da água (kg m^{-3}), estimada pela razão entre a produtividade e a precipitação pluviométrica ocorrida durante o período de cultivo.

5.2.5. Análises estatísticas

As médias obtidas com os ensaios moleculares e bioquímicos foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e ao teste de Bartlett para verificar a homocedasticidade e posteriormente determinados os intervalos de confiança a 95% (Livak e Schmittgen, 2001). As médias das variáveis agronômicas foram submetidas à análise de variância individual e conjunta pelo teste F ($p \leq 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Também foram estimados os seguintes parâmetros genéticos para os caracteres agronômicos: coeficiente de determinação genotípico (CDG) e coeficiente de variação relativa (CVg/CVe). Para a seleção dos genótipos e estimação dos ganhos com a seleção foi utilizado o índice de seleção pela soma de Ranks, proposto por Mulamba e Mock (1978). O software GENES, versão 1990.2019.3 (Cruz, 2013), foi usado para as análises estatísticas.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Transcritos das SODs e atividade bioquímica em genótipos de amendoim

A SOD é a enzima iniciadora do processo de neutralização dos efeitos citotóxicos provocados pelas ROS, com papel importante na inibição e/ou redução de danos celulares. Neste trabalho, o nível de expressão relativa e atividade de três tipos da SOD (*Cu/Zn-SOD*, *Mn-SOD* e *Fe-SOD*) foram investigados em plantas de amendoim submetidas à restrição hídrica. Baseando-se na ação desses três tipos, verificou-se que o input gerado na expressão dos transcritos em cada genótipo correspondeu, também, a uma elevação na atividade de *Cu/Zn-SOD* e *Mn-SOD*, sendo mais substancial nos genótipos eretos (Figura 1A e 1B-*Cu/Zn-SOD*; 1C e 1D-*Mn-SOD*). Para *Fe-SOD*, contudo, a reação foi inversa, com menor atividade em todos os genótipos quando comparada aos outros tipos, com concomitante expressão dos transcritos (Figura 1E e 1F).

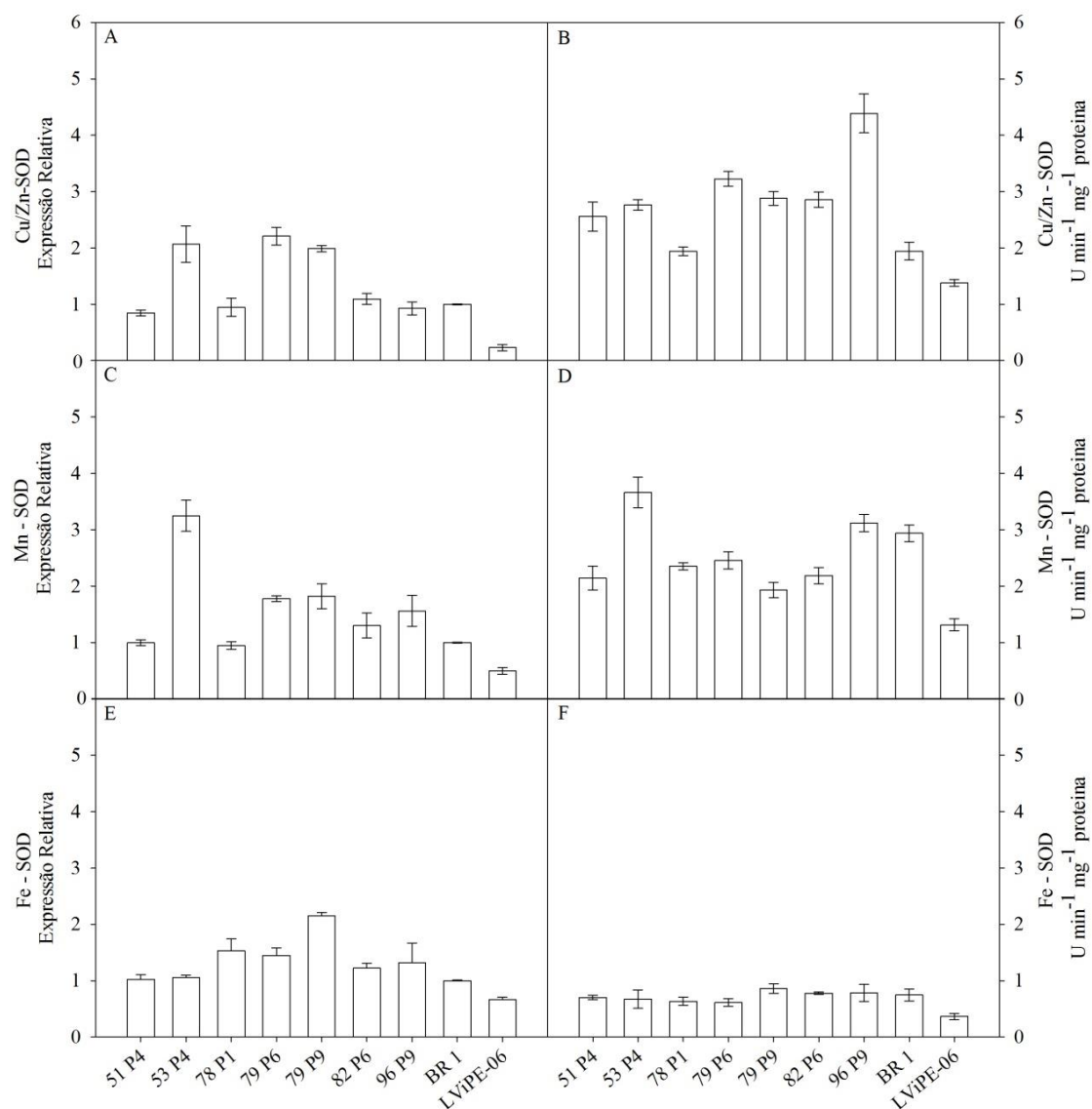


Figura 1: Expressão relativa e atividade de *Cu/Zn-SOD* (A e B), *Mn-SOD* (C e D) e *Fe-SOD* (E e F) em genótipos de amendoim submetidas à suspensão da irrigação. As barras representam o intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

Verificou-se correlação positiva e significativa entre a expressão dos transcritos e a atividades dos três tipos de SOD, exceto para *Cu/Zn-SOD* (Tabela 2). Entre os tipos de SOD, também se constatou correlação significativa tanto para a expressão relativa dos transcritos (CSOD RE x MSOD RE; $r = 0,80^{**}$; CSOD RE x FSOD RE; $r = 0,56^{**}$) como para a atividade (CSOD A x MSOD A; $r = 0,41^*$), o que indica que estas enzimas atuam sinergicamente visando a proteção celular contra danos oxidativos em condição de estresse hídrico. A existência destas correlações indica, ainda, que estas variáveis podem ser utilizadas

como descritores auxiliares no processo de seleção em programas de melhoramento do amendoim visando a tolerância à seca.

Tabela 2. Correlação de Pearson entre as variáveis: expressão relativa e atividade de *Cu/Zn-SOD* (CSOD RE e CSOD A), de *Mn-SOD* (MSOD RE e MSOD A) e de *Fe-SOD* (FSOD RE e FSOD A), expressão relativa de *P5CS* (P5CS RE) e conteúdo de prolina em genótipos de amendoim submetidos à suspensão da irrigação.

Caracteres	CSOD RE	CSOD A	MSOD RE	MSOD A	FSOD RE	FSOD A	P5CS RE	Prolina
CSOD RE	-	0.37 ^{ns}	0.80 ^{**}	0.41 [*]	0.56 ^{**}	0.60 ^{**}	-0.35 ^{ns}	-0.58 ^{**}
CSOD A	-	-	0.43 [*]	0.41 [*]	0.33 ^{ns}	-0.16 ^{ns}	-0.45 [*]	-0.49 ^{**}
MSOD RE	-	-	-	0.68 ^{**}	0.23 ^{ns}	0.37 ^{ns}	-0.21 ^{ns}	-0.48 [*]
MSOD A	-	-	-	-	-0.02 ^{ns}	0.24 ^{ns}	-0.53 ^{**}	-0.60 ^{**}
FSOD RE	-	-	-	-	-	0.54 ^{**}	-0.22 ^{ns}	-0.52 ^{**}
FSOD A	-	-	-	-	-	-	0.03 ^{ns}	-0.24 ^{ns}
P5CS RE	-	-	-	-	-	-	-	0.85 ^{**}
Prolina	-	-	-	-	-	-	-	-

^{ns} - não significativo; * e ** - significativo a $p \leq 0.05$ e $p \leq 0.01$, respectivamente.

As diferenças de um tipo de SOD em relação a outro, como observado neste trabalho, pode ser justificada pela compartimentalização das diferentes SODs na célula (Moraes et al., 2015) e ainda pelo fato de algumas organelas sofrerem primeiro com a seca, como é o caso dos cloroplastos, considerada a principal fonte de ROS celular (Gill e Tuteja, 2010; Barbosa et al., 2014). Expostas à seca, as plantas fecham os estômatos visando diminuir a perda de água, o que provoca, como consequência, maior produção de ROS nos cloroplastos, onde atuam principalmente a *Cu/Zn-SOD* e *Fe-SOD* (Pilon et al., 2011; Huseynova et al., 2014). As mitocôndrias também podem ser consideradas importantes fontes de ROS nas células. Em condições de estresse biótico ou abiótico, a produção do radical superóxido é aumentada nestas organelas em resposta ao aumento da demanda por ATP e intermediários biossintéticos, o que influencia na atividade da *Mn-SOD*, encontrada neste compartimento (Gill e Tuteja, 2010; Taiz et al., 2017).

Segundo Vison et al. (2018) após a percepção da redução na disponibilidade de água, as plantas tolerantes reagem rapidamente para proteger as células contra o estresse oxidativo e os efeitos prejudiciais na célula. Assim, como resposta à possível supergeração de ROS nos cloroplastos e nas mitocôndrias, os genótipos eretos, especialmente em 53 P4 e 96 P9, tiveram

maior expressão e atividade da *Cu/Zn-SOD* e *Mn-SOD*. Este mecanismo está diretamente associado com o nível de tolerância dos alotetraploides à seca, visto que pode evitar ou minimizar danos oxidativos provocados pelo superóxido na maquinaria fotossintética e respiratória. Dutra et al. (2018) avaliaram estes alotetraploides, nos aspectos fisiológicos e agrônômicos, e reportaram que são muito promissores para o cultivo em ambiente semiárido.

Comparada a *Cu/Zn-SOD* ou *Mn-SOD*, o efeito de estresse abiótico sobre a expressão ou atividade da *Fe-SOD* ainda não é claro (Pilon et al., 2011). Inclusive, A *Fe-SOD* não é quantificada em algumas espécies vegetais (Gill e Tuteja, 2010), o que poderia justificar a baixa atividade, quando comparada aos outros tipos, verificada no presente estudo. Tudo isso pode estar relacionado ao fato deste tipo ser considerada a mais arcaica das SODs presentes nas plantas, consistente com a prevalência e pronta disponibilidade de Fe no ambiente redutor em que se acredita que a vida tenha começado (Schäfer e Kardinahl, 2003; Miller, 2012). Segundo Miller (2012), a diminuição da biodisponibilidade na atmosfera e a tendência de envolvimento do Fe nas reações de Fenton com o superóxido, especialmente em condições de estresse oxidativo, pode ter ocasionado a mudança no uso de Fe para outros cofatores como o Mn e o Cu/Zn. Com isso, acredita-se que *Cu/Zn-SOD* evoluiu em resposta ao aumento de oxigênio na biosfera (Pilon et al., 2011), o que poderia explicar a diferença no nível de atividade deste tipo e a *Fe-SOD* verificada nas plantas de amendoim em condição de estresse.

5.3.2. Expressão de P5CS e acúmulo de prolina em genótipos de amendoim

A prolina é um dos principais compostos orgânicos envolvidos na regulação osmótica. Em situação de estresse, o acúmulo na célula é regulado pela proporção entre as taxas de síntese e degradação. A síntese de prolina ocorre principalmente pela via do glutamato, o que se deve ao aumento da atividade de *P5CS*, considerada uma enzima chave para a síntese e acúmulo de prolina em plantas sob estresse (Delauney e Verma, 1993; Gill e Tuteja, 2010; Dobrá et al., 2011).

Neste trabalho, a expressão relativa de *P5CS* foi avaliada nas plantas de amendoim submetidas a estresse hídrico e, subsequentemente, a concentração de prolina livre foi estimada com fins de verificar seu papel efetivo no mecanismo tolerância à seca dos alotetraploides. Nos materiais eretos, a expressão relativa dos transcritos de *P5CS* foi, em média, menos da metade da observada na planta sensível à seca (LViPE-06) (Figura 2A), o que pode indicar menor demanda desse soluto por parte desses materiais. Isto levou ao menor acúmulo de prolina livre nas folhas, em média 11 vezes menor do que a registrada em LViPE-

06 (Figura 2B), evidenciando correlação direta e significativa entre a expressão de *P5CS* e o acúmulo de prolina livre ($r = 0,85^{**}$), tanto nas plantas tolerantes quanto na sensível ao estresse hídrico (Tabela 2). Dobrá et al. (2011) também verificaram relação direta entre *P5CS* e teor de prolina livre em plantas selvagens de tabaco submetidas a estresse hídrico severo. Estes autores verificaram, com a exposição ao estresse hídrico, aumento de aproximadamente 30 e 100 vezes na expressão de *P5CS* e conteúdo de prolina livre, respectivamente.

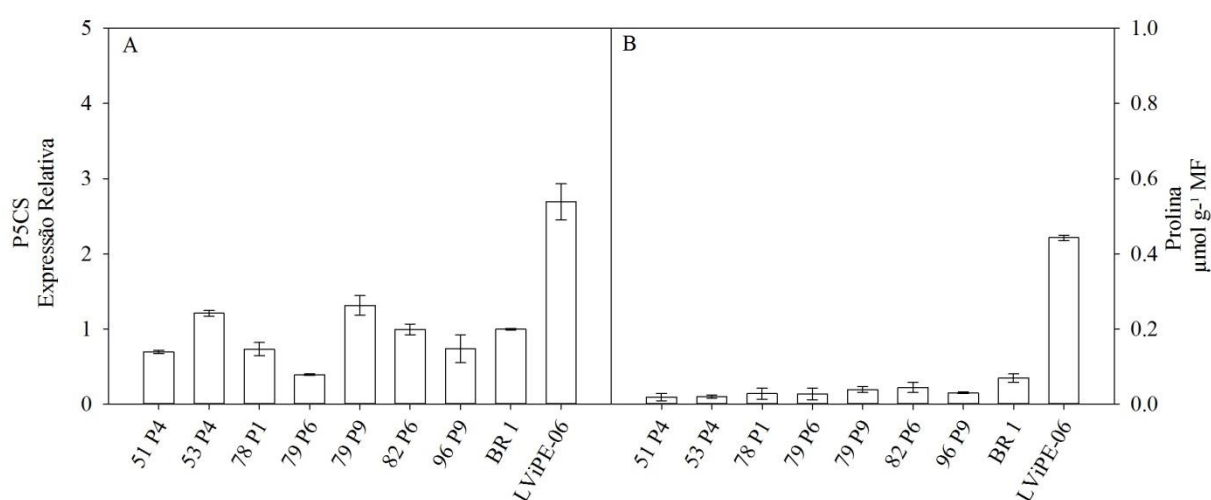


Figura 2: Expressão relativa de *P5CS* (A) e conteúdo de prolina livre (B) em genótipos de amendoim submetidos à suspensão da irrigação. As barras representam o intervalo de confiança a 95% de probabilidade.

O conteúdo de prolina em muitas espécies tem sido relacionado com o nível de tolerância ao estresse, sendo sua concentração geralmente maior em genótipos tolerantes (Ashraf e Foolad, 2007; Ding et al., 2014; Borgo et al., 2015). No entanto, para o amendoim existem relatos divergentes quanto à acumulação em plantas tolerantes expostas à seca (Pereira et al., 2012; 2015), o que pode estar relacionado com outros fatores, como a intensidade do estresse avaliada.

No presente estudo, considerando a sensibilidade à seca da LViPE-06, o elevado conteúdo de prolina livre pode ser entendido como tentativa de ajuste osmótico visando a manutenção de processos celulares importantes, como a fotossíntese. A rápida perda de turgescência observada para este genótipo durante o período de restrição hídrica indica, contudo, que o mecanismo citado pode não ter sido eficiente.

Em plantas transgênicas de tabaco com superexpressão de *P5CS* e acumulação de prolina (10 vezes superior ao controle), Borgo et al. (2015) não verificaram ajustamento

osmótico após 12 dias de estresse hídrico. Isto indica que a efetividade do acúmulo de prolina sobre o ajustamento osmótico pode variar de acordo com a espécie e o genótipo (Borgo et al., 2015), sendo um bom indicador bioquímico e fisiológico dos efeitos do estresse hídrico e não, necessariamente, uma característica de tolerância (Monteiro et al., 2014; Dutra et al., 2017).

Por outro lado, nos genótipos eretos, o baixo nível de expressão de *P5CS* e conteúdo de prolina, reforça a hipótese de que plantas podem ativar diferentes mecanismos visando superar a mesma condição de estresse. Inclusive, neste estudo, verificou-se correlação negativa e significativa entre a atividade de *Cu/Zn-SOD*, *Mn-SOD* e o conteúdo de prolina (Tabela 2), indicando que os genótipos de amendoim ativaram, de maneira isolada, um ou o outro mecanismo. Neste ponto, o diferencial dos genótipos tolerantes, frente ao sensível, envolve não apenas a ativação de um determinado mecanismo, como o ajustamento osmótico ou atividade antioxidativa, mas também a conveniência e eficiência do mesmo, as quais estão relacionadas diretamente com a condição de estresse a qual a planta está exposta.

5.3.3. Validação e seleção de genótipos de amendoim

Os genótipos de amendoim foram cultivados em Lagoa Seca-PB (2016) e Campina Grande-PB (2017), durante a estação das águas. A colheita dos tipos eretos foi procedida aos 90 dias após a emergência (dae), enquanto que da LViPE-06 foi feita aos 120 dae. Os volumes totais de precipitação pluvial registrados durante o cultivo em 2016 e 2017 foram de 125 mm e 315,8 mm, respectivamente (Figura 3). Cinco períodos de veranico foram registrados durante o cultivo, sendo três em Lagoa Seca, com duração de 9 a 16 dias, e dois em Campina Grande, com 10 dias de duração, todos nas fases vegetativa e reprodutiva.

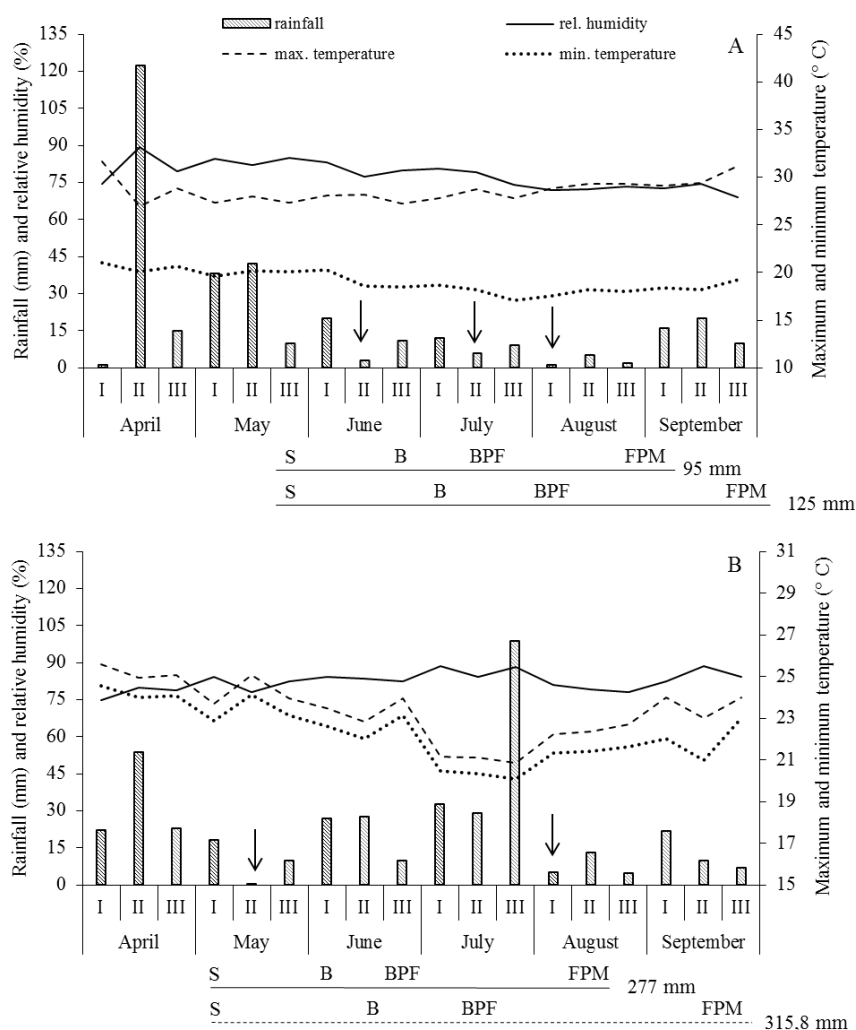


Figura 3: Dados climáticos registrados durante os ensaios em Lagoa Seca (A) e Campina Grande (B), PB, Brasil. S- semeadura, B- início do florescimento, BFP- início da formação de vagens, FPM- maturação completa das vagens. As setas indicam os períodos de veranico. Linhas sólidas e pontilhadas – genótipos eretos e rasteiros, respectivamente. Os valores ao final das linhas sólidas e pontilhadas indicam a precipitação pluvial total durante o ciclo.

O baixo volume de chuvas em um dos ambientes (Lagoa Seca) e os veranicos que ocorreram durante o ciclo das plantas influenciaram na produção e eficiência no uso da água dos genótipos estudados. Na Tabela 3 encontra-se o resumo da análise combinada de variância, as estimativas dos parâmetros genéticos e a média das variáveis avaliadas nos dois ambientes. Verificou-se diferença estatística significativa para PVP, M100V e EUA entre os ambientes e efeito da interação G x E para PVP e EUA. O efeito significativo da interação G x E indica comportamento diferenciado dos genótipos para os dois ambientes avaliados, ou seja, os melhores em um ambiente, não necessariamente, o foram no outro local.

Tabela 3. Resumo da análise de variância combinada, parâmetros genéticos e teste de médias para produção de vagens por parcela (PVP), massa de 100 vagens (M100V) e eficiência no uso da água (EUA) de genótipos de amendoim cultivado em ambientes de Lagoa Seca e Campina Grande, PB, durante a estação das águas de 2016 e 2017, respectivamente.

FV	GL	QM					
		PVP (g)		M100V(g)		EUA (kg m ⁻³)	
Blocos/Locais	4	2372.358		24.288		0.005	
Ambientes (E)	1	2047550.90 ^{**}		2615.846 ^{**}		2.926 ^{**}	
Genótipos (G)	8	82459.165 ^{ns}		428.509 ^{**}		0.346 ^{ns}	
G x E	8	42658.030 ^{**}		36.777 ^{ns}		0.361 ^{**}	
Resíduo	32	2183.032		19.512		0,006	
CV (%)		7.21		3.15		7.25	
CDG (%)		97.35		95.44		98.25	
CVg/CVe		2.48		1.87		3.06	
Médias das variáveis							
Genótipos		PVP (g)		M100V(g)		EUA (kg m ⁻³)	
		LS	CG	LS	CG	LS	CG
51 P4		401.67Bb	824.38Ac	135.55Bb	148.00Ac	1.21Ab	0.89Bb
53 P4		580.25Ba	863.55Ac	133.19Bb	156.83Ab	1.81Aa	0.90Bb
78 P1		370.17Bb	687.05Ad	125.49Bc	139.55Ad	1.10Ab	0.64Bd
79 P6		413.08Bb	739.73Ad	129.85Bc	139.80Ad	1.13Ab	0.69Bd
79 P9		246.08Bd	749.72Ad	130.33Bc	141.79Ad	0.77Ad	0.78Ac
82 P6		336.00Bc	833.97Ac	125.95Bc	134.79Ad	0.92Ac	0.82Ac
96 P9		616.50Ba	1036.3Ab	133.10Bb	148.43Ac	1.90Aa	0.97Bb
BR 1		647.25Aa	714.96Ad	135.17Bb	145.03Ac	1.93Aa	0.67Bd
LViPE-06		471.20Bb	1137.5Aa	148.90Ba	168.60Aa	0.95Bc	1.19Aa
Média		453,58	843,03	133,06	146,09	1,31	0,84

QM – Quadrados médio; FV – Fontes de variação; GL – Graus de liberdade; CV – Coeficiente de variação; CDG – coeficiente de determinação genotípico; CVg/CVe – coeficiente de variação relativa; LS – Lagoa Seca, PB; CG – Campina Grande, PB; **- Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F; ^{ns}- não significativo. PVP- produção de vagens por parcela; M100V- massa de 100 vagens; EUA- eficiência no uso da água. Os valores seguidos pela mesma letra maiúscula não diferem significativamente entre os ambientes e os valores seguidos da mesma letra minúscula não são significativamente diferentes para os genótipos em cada ambiente (teste de Skott-Knott, p <0,05).

Os valores de CDG foram superiores a 95% para todas as características avaliadas (Tabela 3), indicando que as variações na capacidade produtiva e na eficiência do uso da água são, em maior parte, de causa genética. Tal fato permite a seleção mais efetiva dos genótipos superiores, com maior probabilidade de obtenção de sucesso e ganhos expressivos no processo seletivo. A probabilidade de sucesso com a seleção pode ainda ser reforçada pelos valores de CVg/CVe (Vencovsky e Barriga, 1992), cujas estimativas foram superiores a unidade em todas as variáveis (Tabela 3).

As médias de produção (PVP) e peso das vagens (M100 V) em Lagoa Seca foram abaixo do potencial dos genótipos em inverno regular, situando-se em 453,58 g e 133,06 g, respectivamente. A produtividade de LViPE-06, uma rasteira de grãos grandes e de elevada capacidade produtiva, foi inferior a da ereta BR 1, confirmando sua larga sensibilidade a ambientes com baixa disponibilidade hídrica (Pereira et al., 2016). Em Campina Grande, como a disponibilidade hídrica foi melhor no período de formação das vagens (Figura 3), a produção das plantas foi compensada tanto nos genótipos eretos quanto no rasteiro, cujo incremento na média de PVP e M100V foi de 54% e 10%, respectivamente. As linhagens 96 P9 e 53 P4 se destacaram como mais promissoras nos dois ambientes, uma evidência de se ajustarem melhor a ambientes com baixa disponibilidade hídrica (Lagoa Seca), baseando-se nos valores de EUA, semelhante estatisticamente à genitora BR 1 (Tabela 3), que possui adaptação a ambiente semiárido (Gomes et al, 2007; Pereira et al, 2016).

Com o intuito de selecionar os genótipos mais promissores, com elevada capacidade produtiva e eficiência no uso da água, foi construído o índice de seleção de Mulamba e Mock (1978), utilizando todas as características agronômicas avaliadas nos dois ambientes. Baseando-se neste índice, as linhagens 96 P9 e 53 P4 foram superiores aos demais genótipos avaliados. Com a seleção destes materiais, é possível se obter ganhos percentuais consideráveis, principalmente para PVP (18,9%) e EUA (29,84%) (Tabela 4), o que representa aumento de 122,52 g e 0,32 kg m⁻³, respectivamente. Similarmente, estas duas linhagens também se destacaram quanto à expressão e atividade das SODs (Figura 1), principalmente *Cu/Zn-SOD* e *Mn-SOD*, o que pode ter influencia sobre o desempenho produtivo em condição de déficit hídrico, por ser considerado mecanismo no processo de tolerância à seca. Tudo isto denota sucesso na introgressão de genes selvagens de *Arachis* para o amendoim cultivado e amplia a possibilidade de geração de novas cultivares para o cultivo em condições de semiárido brasileiro.

Tabela 4: Ganhos de seleção estimados para produção de vagens por parcela (PVP), massa de 100 vagens (M100V) e eficiência no uso da água (EUA) por meio do índice de Mulamba e Mock (1978).

Variáveis	Xo	Xs	GS	GS (%)
PVP	648.30	774.16	122.52	18.90
M100V	140.02	142.89	2.74	1.95
EUA	1.07	1.40	0.32	29.84

Xo – média da população original; Xs – média da população selecionada; GS – ganho total coma a seleção.

O melhoramento de espécies cultivadas baseando-se na introgressão de genes oriundos de espécies selvagens não é amplamente adotado por melhorista devido a algumas dificuldades nos processos de cruzamento, em especial as barreiras cromossômicas. Quando se obtém sucesso, contudo, representa uma oportunidade ampla de melhorar a base genética de cultivares que, via de regra, é estreita em função do uso recorrente nos trabalhos de melhoramento. Os resultados aqui apresentados são relevantes para o melhoramento do amendoim voltado para ambiente semiárido por se constatar plasticidade genética dos anfidiplóides herdada pela combinação de genitores oriundos de três diferentes espécies, *A. hypogaea*, *A. batizocoi* e *A. duranensis*. Essa última é originária de regiões com precipitação pluvial relativamente baixa, portanto, possui características que podem conferir melhor desempenho em certas condições de déficit hídrico, como por exemplo, o perfil conservativo de transpiração (Leal-Bertioli et al. 2012). Vison et al. (2018), avaliando o transcriptoma de espécies de *Arachis* em condições de desidratação, verificaram melhor resposta adaptativa na *A. duranensis*, com uma série de genes comuns e exclusivamente regulados, envolvidos com mecanismos de resposta ao déficit hídrico. Tais resultados, junto com os apresentados neste trabalho, reforçam a importância do uso de espécies selvagens de *Arachis* no melhoramento do amendoim, por poderem contribuir com alelos positivos para características agronômicas de interesse, além de diversidade necessária para características adaptativas, como a tolerância a estresses abióticos (Leal-Bertioli et al. 2018). Esses autores verificaram, por meio de análise genética de uma população de plantas oriundas do cruzamento da cv. Runner-886 com um alotetraploide induzido ($[A. ipaënsis \times A. duranensis]^{4x}$), que alta proporção de alelos selvagens de *Arachis* pode ser introgridido para o amendoim, mantendo o fenótipo e os bons rendimentos da espécie cultivada e aumentando a resistência a doenças.

5.4. Conclusões

Os alotetraploides possuem níveis diferenciados de expressão nos tipos de SOD e no precursor de prolina, havendo relação entre a produção dos transcritos e a subsequente síntese dos metabólitos. Como essas vias foram bem distintas no genótipo rasteiro, a falta de variação entre esses componentes nos alotetraploides pode ser devida ao nível equilibrado de tolerância à seca que eles detêm, embora duas linhagens tenham se destacado na produção e uso eficiente da água. As linhagens 96 P9 e 53 P4, por se destacarem como mais promissoras, devem ser foco em trabalhos de melhoramento visando à ampliação da base genética e desenvolvimento de novas cultivares para o ambiente semiárido.

5.5. Referências

- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>.
- Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exper Bot* 59: 206-216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>.
- Barbosa MR, Silva MMA, Willadino L, Ulisses C, Camara TR (2014) Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Cienc Rural* 44: 453-460. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782014000300011>.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. Short communication. *Plant Soil* 39: 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>.
- Borgo L, Marur CJ, Vieira LGE (2015) Effects of high proline accumulation on chloroplast and mitochondrial ultrastructure and on osmotic adjustment in tobacco plants. *Acta Sci Agron* 37: 191-199. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v37i2.19097>.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

- Cruz CD (2013) GENES: A software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Sci Agron* 35: 271-276. <http://dx.doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>.
- DaCosta M, Huang B (2006) Osmotic adjustment associated with variation in bentgrass tolerance to drought stress. *J Am Soc Hortic Sci* 13: 338-344.
- Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 4: 215-223. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04020215.x>.
- Ding H, Zhang ZM, Qin FF, Dai LX, Li CJ, Ci DW, Song WW (2014) Isolation and characterization of drought-responsive genes from peanut roots by suppression subtractive hybridization. *Electron J Biotechn* 17: 304-310. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.09.004>.
- Dobrá J, Vanková R, Havlová M, Burman AJ, Libus J, Storchová H (2011) Tobacco leaves and roots differ in the expression of proline metabolism-related genes in the course of drought stress and subsequent recovery. *J Plant Physiol* 168: 1588-597. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.02.009>.
- Doorenbos J, Kassam, AH (1979) Crop yield response to water (FAO Irrigation and Drainage, Paper 33). Rome: FAO.
- Dutra WF, Melo AS, Suassuna JF, Dutra AF, Silva DC, Maia JM (2017) Antioxidative responses of cowpea cultivars to water deficit and salicylic acid treatment. *Agron J* 109: 895-905. <https://doi.org/10.2134/agronj2015.0519>.
- Dutra WF, Guerra YL, Ramos JPC, Fernandes PD, Silva CRC, Bertoli DJ, Leal-Bertoli SCM, Santos RC (2018) Introgression of wild alleles into the tetraploid peanut crop to improve water use efficiency, earliness and yield. *Plos One* 13: e0198776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198776>.
- Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D, Basra SMA (2009) Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. *Agron Sustain Dev* 29: 185-212. <https://doi.org/10.1051/agro:2008021>.
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59: 309-314.

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48: 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>.

Gomes LR, Santos RC, Anunciação Filho CJ, Melo Filho PA (2007) Adaptabilidade e estabilidade fenotípica em genótipos de amendoim de porte ereto. *Pesq Agropec Bras* 72: 985-989. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2007000700010>.

Holbrook CC, Timper P, Culbreath AK, Kvien CK (2008) Registration of ‘Tifguard’ peanut. *J Plant Regist* 2: 92-94. <http://dx.doi.org/10.3198/jpr2007.12.0662crc>.

Huseynova IM, Aliyeva DR, Aliyev JA (2014) Subcellular localization and responses of superoxide dismutase isoforms in local wheat varieties subjected to continuous soil drought. *Plant Physiol Biochem* 81: 54-60. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.01.018>.

Isleib TG, Milla-Lewis SR, Pattee HE, Copeland SC, Zuleta MC, Shew BB, Hollowell JE, Sanders TH, Dean LO, Hendrix KW, Balota M, Chapin JW (2011) Registration of Bailey peanut. *J Plant Regist* 5: 27-39. <https://doi.org/10.3198/jpr2009.12.0742crc>.

Leal-Bertioli SCM, Bertioli DJ, Guimarães PM, Pereira TD, Galhardo I, Silva JP, Brasileiro ACM, Oliveira RS, Silva PIT, Vadez V, Araujo ACG (2012) The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits. *Environ Exper Bot* 84: 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.005>.

Leal-Bertioli SCM, Santos SP, Dantas KM, Inglis PW, Nielen S, Araújo ACG, Silva JP, Cavalcante U, Guimarães PM, Brasileiro ACM, Carrasquilla-Garcia N, Penmetsa RV, Cook D, Moretzsohn MC, Bertioli DJ (2015) *Arachis batizocoi*: a study of its relationship to cultivated peanut (*A. hypogaea*) and its potential for introgression of wild genes into the peanut crop using induced allotetraploids. *Ann Bot* 115:237-249. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu237>.

Leal-Bertioli SCM, Godoy IJ, Santos JF, Doyle JJ, Guimarães PM, Abernathy1 BL, Jackson SA, Moretzsohn MC, Bertioli DJ (2018) Segmental allopolyploidy in action: Increasing diversity through polyploid hybridization and homoeologous recombination. *Am J Bot* 105: 1053-1066. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1112>.

- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Miller A (2012) Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Lett* 586: 585-595. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.048>.
- Monteiro JG, Cruz FJR, Nardin MB, Santos DMM (2014) Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e a putrescina exógena. *Pesq Agropec Bras* 49: 18-25. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2014000100003>.
- Moraes PF, DeLaat DM, Santos MEAHP, Colombo CA, Kiihl T (2015) Expressão gênica diferencial em genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) submetidos a déficit induzido por PEG. *Bragantia* 74: 25-32. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.0207>.
- Moretzsohn MC, Barbosa AVG, Alves-Freitas DMT, Teixeira C, Leal-Bertioli SCM, Guimarães PM, Pereira RW, Lopes CR, Cavallari MM, Valls JFM, Bertioli DJ, Gimenes MA (2009) A linkage map for the B-genome of *Arachis* (Fabaceae) and its synteny to the A-genome. *BMC Plant Biol* 9: 40-50. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-40>.
- Mulamba NN, Mock JJ (1978) Improvement of yield potential of the Eto Blanco maize (*Zea mays* L.) population by breeding for plant traits. *Egypt J Genet Cytol* 7: 40-51.
- Pereira JW, Melo Filho PA, Albuquerque MB, Nogueira RJME, Santos RC (2012) Mudanças bioquímicas em genótipos de amendoim submetidos a déficit hídrico moderado. *Cien Agron* 43: 766-773. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-66902012000400019>.
- Pereira JW, Silva ECA, Luz LN, Nogueira RJMC, Melo Filho PA, Lima LM, Santos RC (2015) Cluster analysis to select peanut drought tolerance lines. *Aust J Crop Sci* 11: 1095-1105.
- Pereira JW, Albuquerque MB, Melo Filho PA, Nogueira RJMC, Lima LM, Santos RC (2016) Assessment of drought tolerance of peanut cultivars based on physiological and yield traits in a semiarid environment. *Agr Water Manage* 166: 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.12.010>.

- Pilon M, Ravet K, Tapken W (2011) The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta* 1807: 989-998. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2010.11.002>.
- Santos RC, Rego GM, Santos CAF, Melo Filho PA, Silva APG, Gondim TMS, Suassuna TF (2006) Recomendações técnicas para o cultivo do amendoim em pequenas propriedades agrícolas do Nordeste brasileiro. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 7p. (Embrapa Algodão. Circular técnica, 102).
- Scandalios JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38: 995-1014. <https://doi.org/S0100-879X2005000700003>.
- Schäfer G, Kardinahl S (2003) Iron superoxide dismutase: structure and function of an archaic enzyme. *Biochem Soc Trans* 31: 1330-1334. <https://doi.org/10.1042 / bst0311330>.
- Simpson CE, Starr JL (2001) Registration of ‘Coan’ peanut. *Crop Sci* 41: 918-920. <https://doi.org/10.2135 / cropsci2001.413918x>.
- Simpson CE, Starr JL, Church GT, Burrow MD, Paterson HA (2003) Registration of NemaTAM peanut. *Crop Sci* 43: 1561. <https://doi.org/10.2135 / cropsci2003.1561>.
- Taiz L, Zeiger E, Moller I, Murphy A (2017) Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Artmed, Porto Alegre.
- Valls JFM, Costa LC, Custódio AR (2013) A novel trifoliolate species of *Arachis* (Fabaceae) and further comments on the taxonomic section *Trirectoides*. *Bonplandia* 22: 91-97.
- Vencovsky R, Barriga P (1982) Genética biométrica no fitomelhoramento. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 496 p.
- Vison CC, Mota APZ, Oliveira TN, Guimaraes LA, Leal-Bertioli SCM, Williams TCR, Nepomuceno AL, Saraiva MAP, Araujo ACG, Guimaraes PM, Brasileiro ACM (2018) Early responses to dehydration in contrasting wild *Arachis* species. *Plos One* 13: e0198191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198191>.
- Yu Q, Rengel Z (1999) Micronutrient deficiency influences plant growth and activities of superoxide dismutases in narrow-leaved lupins. *Ann Bot* 83: 175-182. <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0811>.

6. CONCLUSÕES GERAIS

- Espécies selvagens de *Arachis* podem ser utilizadas no melhoramento do amendoim para as condições de semiárido.
- A introgressão de alelos selvagens melhora a capacidade fotossintética, a eficiência do uso da água, a atividade antioxidativa e a capacidade produtiva do amendoim cultivado.
- Os alotetraploides 53 P4 e 96 P9 possuem características de tolerância à seca, podendo ser utilizados em futuros trabalhos de melhoramento com o objetivo de obter novas cultivares com essa característica.